

**TARTU ÜLIKOOL  
ÖKOLOOGIA JA MAATEADUSTE INSTITUUT  
ZOOLOOGIA OSAKOND  
ENTOMOLOOGIA ÕPPETOOL**

**Merili Martverk**

# **SOOTI ERINEV MUNA SUURUS LIBLIKATEL**

Bakalaureusetöö

Juhendajad: prof. Toomas Tammaru  
PhD Tambet Tõnissoo  
MSc Riho Meier

TARTU 2016

## **Sooti erinev muna suurus liblikatel**

Sooline dimorfism on bioloogide huviorbiidis olnud juba pikka aega, kuid suhteliselt vähe on olnud uurimistöid, mis käsitlevad dimorfismi kujunemist ontogeneesis. Viimasel ajal on dimorfismi ontogeneetilist kujunemist rohkem uuritud, kuid selliste uurimuste keskmes on olnud peamiselt kasvukiirus ja arengukestus. Ometi on dimorfismi kujunemisel ka võimalus, et erinevus on olemas juba algusest peale ehk siis sünnil või koorumisel. Käesolev töö keskendub dimorfismi uurimisel just nimelt sellele võimalusele. Töös antakse ülevaade munaraku arengust, soo määramise mehhanismidest ja empiirilistest uurimustest muna suuruse soolise dimorfismi kohta putukatel. Refereerides liblika munaraku arengu kohta teada olevat ei leitud ühtegi asjaolu, mis välistaks dimorfismi kujunemist juba munastaadiumis. Samas leiti, et sellist nähtust on dokumenteeritud putukate seas vaid haplodiploidse soo määramise mehhanismiga kiletiivalistel.

Märksõnad: Sooline dimorfism, *Lepidoptera*, oogenees, soo määramine, muna suurus

## **Sexual size dimorphism and egg size in *Lepidoptera***

Even if studies on sexual size dimorphism (SSD) have a long history, ontogenetic mechanisms leading to unequal sizes of males and females have received little attention. Since recently, interest in ontogenetic patterns behind SSD has been growing but these studies have mostly been focusing on growth rate and development time. However, there is one more way to achieve SSD: initial size difference among new-born individuals or eggs. The present study focuses on that possibility. This study presents data on the empirical studies on egg size dimorphism in insects. It also gives an overview of oocyte development and sex determination mechanisms. From the literature reviewed, no reasons could be found that would exclude the possibility of SSD being present already in egg sizes. Yet, in insects, this possibility has been documented only in Hymenoptera, an order with haplodiploid sex determination.

Key words: Sexual size dimorphism, *Lepidoptera*, oogenesis, sex determination, egg size

# Sisukord

1. Sissejuhatus .....	4
2. Oogenees .....	8
2.1 Oogeneesi tüübid .....	8
2.2 Suguorganite morfoloogia .....	8
2.2.1 Munasarja tüübid .....	10
2.3 Okteti moodustamine .....	12
2.4 Vitellogeneesile eelnev periood (previtellogenic period) .....	13
2.5 Vitellogenees .....	14
2.6 Vitellogeneesi järgne periood .....	16
2.6.1 Koorioni moodustamine .....	16
2.7 Hormonaalne kontroll .....	17
2.8 Meioos ja viljastumine .....	18
3. Soo määramise mehhanismid .....	21
3.1 Ülevaade soo determinatsioonist loomadel .....	21
3.2 Soo määramise mehhanismid putukatel .....	22
4. Referatiivne ülevaade muna suuruse sugulisest dimorfismist .....	25
4.1 Muna suuruse suguline erinevus on leitud .....	25
4.2 Muna suuruse sugulist erinevust ei ole leitud .....	27
Arutelu .....	29
Kokkuvõte .....	32
Summary .....	33
Tänuavaldused .....	34
Kasutatud kirjanduse loetelu .....	35
Lihtlitsents .....	40

## 1. Sissejuhatus

Sooline dimorfism kehasuuruses (*sexual size dimorphism*) on defineeritud kui keskmise kehasuuruse erinevus sugude vahel, kuid võib tähendada ka kindla kehaosa suuruse sugudevahelist erinevust (Fairbairn & Blanckenhorn 2007). Kuna käesolev töö käsitleb soolisi erinevusi vaid kehasuuruses kui tervikus, tuleb „soolist dimorfismi“ edaspidi mõista siin just selles tähenduses.

Soolise dimorfismi väljendamisel kasutatakse erinevaid kehasuuruse mõõte. Madudel, sisalikel ja konnadel mõõdetakse tüvepikkust (*snout-vent length*), seevastu lindudel ja imetajatel on kõige levinumaks meetodiks kaalumine. Kasutusel on ka luustiku parameetritel põhinevad mõõdud, näiteks kolju mõõtmed ja õlakõrgus. Putukatel mõõdetakse suuruse määramiseks enamasti pea laiust, jala segmentide pikkusi, tiiva ning ka kogu keha pikkust (Hormiga jt. 2000; Fairbairn & Blanckenhorn 2007). Kehasuuruse väljendamise meetodi valikul on oluline mõõtmise korratavus, näiteks kaalumise puhul mõjutab keha massi oluliselt isendi hüdratsioon ja toitumisseisund (Fairbairn & Blanckenhorn 2007). Soolist dimorfismi väljendatakse kvantitatiivselt kõige sagedamini lihtsa sugupoolte suuruste suhtena (nt 1,3 korda) või proportsionaalse suuruse erinevusega (nt 30%) (Lovich & Gibbons 1992; Fairbairn & Blanckenhorn 2007). Samuti on kasutusel kehasuuruse dimorfismi indeks (*size dimorphism index*), mis saadakse ühe lahutamisel sugupoolte suuruste suhtest (nt 0,3). Kui suuremaks sugupooleks on isased, korrutatakse saadud väärtus miinus ühega; kui suuremad on emased, jäetakse väärtus teisendamata (Lovich & Gibbons 1992; Fairbairn & Blanckenhorn 2007).

Sooline dimorfism on tavaline nähtus pea kõigis lahksooliste organismide rühmades (Fairbairn & Blanckenhorn 2007). Tavaliselt on endotermsetele (aktiivne kehatemperatuuri hoidmine) selgroogsetele (imetajad ja linnud) iseloomulik, et isased on suuremad ning ektotermsetele loomadele (kalad, kahepaiksed, roomajad ja selgrootud) on iseloomulik, et emased on suuremad (Fairbairn & Blanckenhorn 2007). Kuigi imetajatel ja lindudel on tavaliselt isased suuremad, siis erandiks on näiteks käsitiivaliste (*Chiroptera*), jäneseliste (*Lagomorpha*) ja kakuliste (*Stigiformes*) seltsid, kus emased on isastest suuremad (Ralls 1976; Fairbairn 1997; Fairbairn & Blanckenhorn 2007). Mõõdukaks peetakse soolist dimorfismi, mille puhul kehasuuruste erinevus on kuni 10% (Fairbairn &

Blanckenhorn 2007). Inimestel on mehed naistest keskmiselt 7% pikemad (Gustafsson & Lindenfors 2004; Fairbairn & Blanckenhorn 2007).

Ekstreemsemad soolise dimorfismi näited on lindudel kanaliste (*Galliformes*) seltsis ning imetajatel kiskjaliste (*Carnivora*) ja esikloomaliste (*Primates*) seltsides, kus mõne liigi isased on emastest kaks korda raskemad (Fairbairn 1997; Fairbairn & Blanckenhorn 2007). Imetajate dimorfismi kõige märkimisväärsim näide on lõunalonthüljes (*Mirounga leonina*), kus isased võivad olla emastest kuni seitse korda raskemad (Lindenfors jt. 2002; Fairbairn & Blanckenhorn 2007). Kõrgeim soolise dimorfismi väärtus olukorras, mil isased on emastest suuremad, on läikkiriahvena perekonna kalaliigil *Lamprologus callipterus*, kelle isased on emastest kaksteist korda raskemad (Schutz & Taborsky 2000; Fairbairn & Blanckenhorn 2007).

Ka neil loomadel, kel emane on isasest suurem, leidub ekstreemseid soolise dimorfismi näiteid, nagu võrkurlaste (*Araneidae*) sugukonda kuuluv ämblik *Argiope aurantia*, kelle emase kehapiikkus on isase omast üle kolme korra lühem (Vollrath 1998; Fairbairn & Blanckenhorn 2007). Soolise dimorfismi rekord kuulub kaheksajalale *Tremoctopus violaceus*, kus emane on isasest 100 korda pikem ja kuni 40000 korda raskem (Norman jt. 2002; Fairbairn & Blanckenhorn 2007).

Putukaliikidel on valdavalt emased suuremad kui isased (Teder & Tammaru 2005). Enamasti on neil emased kuni 1,4 korda isastest raskemad (Teder & Tammaru, 2005, uurimuses 85 liigil 142-st), mõnel juhul emased veelgi suuremad (47 liiki 142-st), mille seas on ka ekstreemsemaid näiteid, kus emased kaaluvad üle 1,8 korra rohkem kui isased (17 liiki 142-st). Vähestel juhtudel olid isased emastest suuremad (10 liiki 142-st). Liigisisene sooline dimorfism ei ole putukatel konstantne suurus ning sõltub keskkonnatingimustest (Teder & Tammaru 2005).

Peamiseks soolise dimorfismi tekke evolutsiooniliseks põhjuseks peetakse emaste ja isaste erinevaid rolle sigimises (Fairbairn & Blanckenhorn 2007). Kehasuurus mõjutab paljunemisedukust emastel ja isastel eri viisidel, mõjutades emastel eelkõige viljakust ja isastel eelkõige paaritumisedukust. Kehasuurus, mis maksimeerib kohasuse (= optimaalne kehasuurus) võib seetõttu olla sooti erinev (Fairbairn & Blanckenhorn 2007).

Soolise dimorfismi evolutsiooni mõjutavad ka geneetilised piirangud, nimelt on ju sama liigi isas- ja emasorganismidel suuremas osas identsed geenid, samas viib antagonistlik valik erinevate optimumide tekkele isastel ja emastel. Kui mõlemal sool on tunnused määratud samade geenidega, siis ongi tulemuseks on geneetiline konflikt (Bonduriansky & Rowe 2005; Fairbairn & Blanckenhorn 2007). Kui kehasuurse

geneetiline determinatsioon oleks eri sugupooltel täiesti identne, siis sooline dimorfism ei saakski evolutsioneeruda (Fairbairn 1997; Fairbairn & Blanckenhorn 2007).

Loomade sugulise dimorfismi tekkeks ontogeneesis on kolm võimalust. Esiteks on võimalik, et suguline erinevus on olemas juba munastaadiumis/sünnil. Teiseks võimaluseks on see, et suuruse varieeruvus tekib kasvuperioodide pikkuste soolise erinevuse kaudu, ehk siis nii, et üks sugupool kasvab kauem (Blanckenhorn jt. 2007). Kolmandaks, dimorfism saab tekkida ka erinevate kasvukiiruste tõttu (Blanckenhorn jt. 2007).

Selgroogseil on soolise dimorfismi kujunemine ontogeneesis tugevalt vanemate kontrolli all. Vanemad, eriti emad, saavad mõjutada oma järglaste sugulist dimorfismi kasvukeskkonda muutes. Sooline dimorfism võib tekkida ka sellest, et ema hoolitseb eri soost järglaste eest ebavõrdselt (Holden & Mace 1999; Badyaev 2002). Ibeeria kuldnokk (*Sturnus unicolor*) varustab toitainetega emas- ja isasembrüoid erinevalt, mis viib järglaste seas soolise dimorfismi tekkeni. Täpselt ei ole siiski teada, kuidas muna suurus määratakse (Cordero jt. 2001; Badyaev 2002). Ema päritolu steroididega kokkupuude võib mõjutada kasvuhormoonitundlikkust selgroogsete embrüo kudedes (Cordero jt. 2001; Badyaev 2002). Uuringus, mis käsitles 109 primaadi liigi ontogeneetilist arengut, leiti, et täiskasvanueas suure dimorfismiga liikidel oli juba sündides väga väike, kuid siiski tuvastatav sooline erinevus (Smith & Leigh 1998; Badyaev 2002). Sooline dimorfism sünnil ja varajases kasvus on tugevalt mõjutatud ema keha suuruse ja imetamise poolt. Nimelt imetavad emad järglasi võrdselt ka kõige suurema soolise dimorfismiga liikidel emad ning see ei lase kõrgel soolise dimorfismi väärtusel varakult välja kujuneda (Badyaev 2002).

Putukatel saab kasvuperiood pikeneda kahte moodi: esiteks võib ühel sugupoolel olla rohkem kasvujärke (Esperk jt. 2007). Teiseks, kui kasvujärkude arv on muutumatu võib suurem sugupool pikendada oma arengut mitmes erinevas kasvujärgus (Tammaru jt. 2010). Nii kasvuperioodiga (näiteks Tammaru jt. 2010; Teder 2014) kui kasvukiirusega seotud dimorfism (näiteks Wiklund & Forsberg 1991) on putukaliikide hulgas laialt levinud. Samuti on võimalik nende mehhanismide omavaheline kombineerumine (Blanckenhorn jt. 2007).

Soolise dimorfismi kujunemine putukate ontogeneesis on huviorbiidis olnud pikka aega. Peamiselt on küll siiani keskendatud soolistele erinevustele kasvukiiruses ja -ajas ning oluliselt vähem on uuritud võimalust, et putukatel võiks suguline dimorfism olemas olla juba algusest, st. munast peale. Käesoleva bakalaureusetöö eesmärgiks ongi

keskenduda sooti erinevale muna suurusele kui dimorfismi kujunemise ühele võimalusele. Bakalaureusetöö annab ülevaate siiani tehtud töödest, kus on uuritud putukatel (lisaks mõned teised lülijalgsete) sooti erinevat muna suurust. Samuti käsitleb liblikate varajast arengut eesmärgiga uurida, kas arengubioloogilised mehhanismid üldse võimaldavad sooti erinevat muna suurust. Oluline on siinjuures asjaolu, et liblikatel on emane heterogameetne ja järglaste sugu sõltub sellest, kuidas sugukromosoomid paiknevad oogeneesi I metafaasis. Esitatud analüüs keskendub küsimusele, kas emaliblikas saab mõjutada järglase sugu lähtuvalt muna suurusest. Järgnev oogeneesi peatükk keskendub liblika munaraku kasvule ja arengule, kuid samaaegselt pakub ka taustinfot teiste putukagruppide oogeneesi kohta. Seejärel käsitleb bakalaureusetöö põhjalikult sugupoole determinatsiooni mehhanisme liblikatel, esitades ka taustinfot soo määramise kohta teistel loomarühmadel.

## 2. Oogenees

### 2.1 Oogeneesi tüübid

Loomadel arenevad sugurakud enamasti gonaadides, kus munaraku kasvamisel on suur roll mitmetel abirakkudel. Oogeneesi (munaraku areng) puhul saab eristada solitaarset oogeneesi ja alimentaarset oogeneesi. Solitaarseks oogeneesiks nimetatakse ootsüüdi kasvu ilma saatvate rakkude abita (Garbiec jt. 2015). Solitaarne oogenees on iseloomulik karpidele (*Bivalvia*), kus arenevad ootsüüti ei ümbritse täielikult follikulaarrakkude kiht. Varajastes oogeneesi etappides on ootsüüdid lühiajaliselt seotud follikulaarrakkudega, kuid seejärel rakud eemalduvad ootsüüdist (Ituarte 2009). Alimentaarses oogeneesis on ootsüüdi kasvuks vajalikud ka somaatilised follikulaarrakud ja/või abirakud. Viimased on tihedalt munarakkudega seotud. Putukatele on iseloomulik alimentaarne oogenees (Garbiec jt. 2015).

Kuna paljud liblikad ei toitu valmikueas ning valmikute eluiga on lühike, tähendab see seda, et emasel organismil peab juba nukust väljumisel olema enamik munadest valmis viljastamiseks ja munemiseks tundide jooksul (Swevers jt. 2005). Siidiliblika (*Bombyx mori*) oogenees algab varakult juba nukueas (teistel andmetel 4. kasvujärgus) ja lõpeb eelvalmiku (*pharate adult*) staadiumis. Eelvalmikuks nimetatakse arengustaadiumit, mil putukas on läbinud metamorfoosi, kuid pole veel nukukestast väljunud (Telfer 2009; Papantonis jt. 2014).

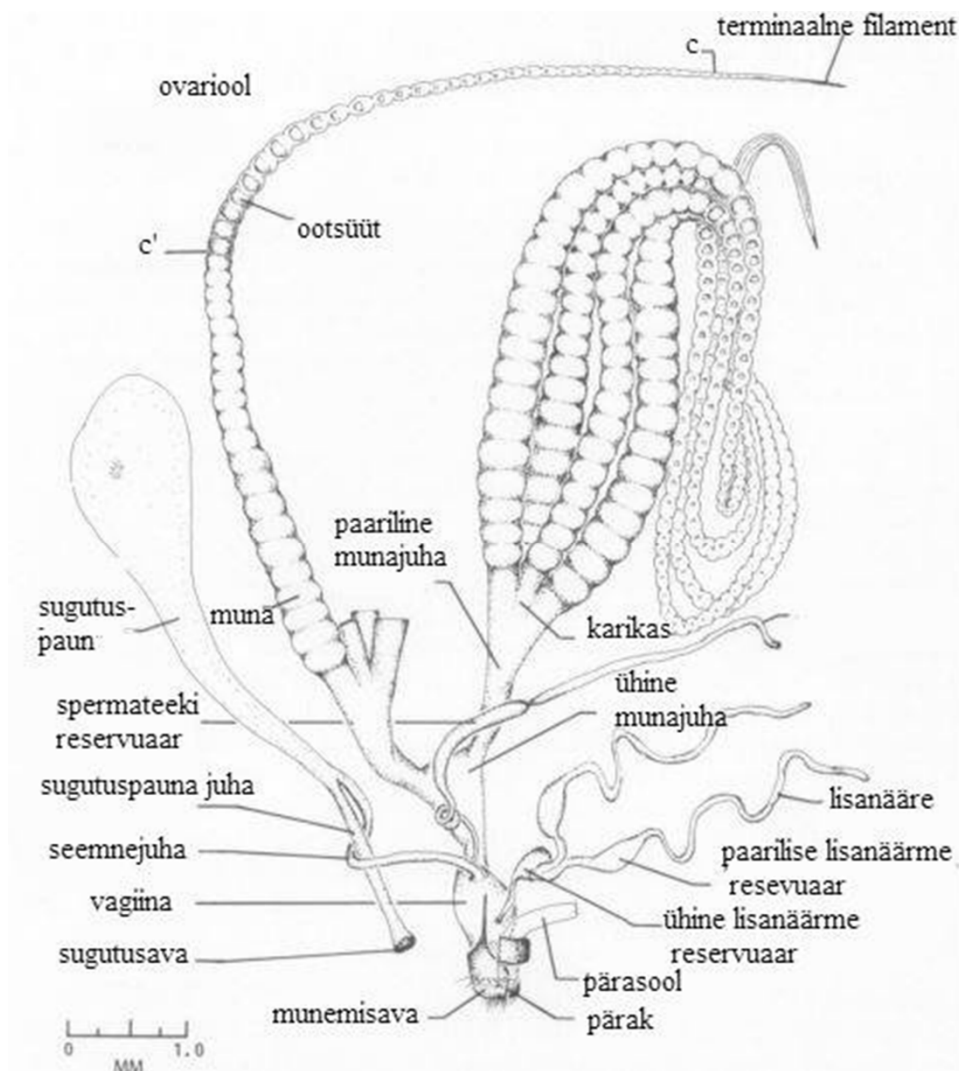
Siidiliblika oogeneesi protsessi reguleerib hormoon 20-hüdroksüekdüsoon (20E). 20E on putukate peamise ektüsteroidi ekdüsooni aktiivne vorm (Papantonis jt. 2014). Ekdüsooni sünteesitakse protorakaalnäärmetes e. eesrindmikunäärmetes ja tema peamiseks ülesandeks on vastse kestumisprotsesside reguleerimine (Valle 1993). Seevastu äädikakärbsel (*Drosophila melanogaster*) algab oogenees valmikustaadiumis ja seda reguleeritakse nii juveniilhormooni (JH) kui ka 20-hüdroksüekdüsooni poolt (Papantonis jt. 2014). Juveniilhormoon on aktiivne hormoon, mida sünteesitakse saaterakkudes (*corpora allata*) (Papantonis jt. 2014).

### 2.2 Suguorganite morfoloogia

Emase putuka suguorganid moodustuvad munasarjadest ja Y-kujulisest munajuhast, mis lõpeb vagiina ja genitaalavaga (Joonis 1.). Munasarjad koosnevad torukujulistest



ovarioolidest, mis suubuvad munajuhasse. Ootsüütide areng toimub nende teekonnal ovariooli tipust munajuhasse (Tworzydło jt. 2010).



**Joonis 1. Emase liblika suguorganite morfoloogia.** Nokköörlase *Hypena scabra* emasel liblikal on paariline munasari, mis kumbki koosneb 4 ovarioolist. Ovarioolides arenevad ootsüüdid. Ovariool on jagatud kolmeks osaks. Terminaalsest filamendist kuni tähiseni C on germaarium, kus toimub okteti moodustumine, C-C' piirkonnas on erineva arengustaadiumiga ootsüüdid ning toimub vitellogenees ja koorini moodustumine, C' tähistab kohta, millest alates munad on ovulatsiooniks valmis (modifitseeritud Buntin & Pedigo 1983 järgi).

Ovariooli ja munasarja ümbritsevate lihaste peristaltilised kokkutõmbed panevad folliikuli liikuma (Hudson & Cooley 2014). Ovariooli võib jagada kolmeks struktuurseks osaks: terminaalseks e. lõpmiseks filamendiks (ing. k. *terminal filament*), germaariumiks e. idusarjaks ja vitellaariumiks e. rebusarjaks. Terminaalne filament seob ovariooli rasvkehaga. Germaariumis toimub idurakkude mitootiline jagunemine (Joonis 2.) (Garbiec jt. 2015). Idurakud on sugurakkude eellased ning neist arenevad ootsüüdid või ootsüüt ja

toiterakud, sõltuvalt munasarja tüübist. Vitellaariumis toimub munasarjafolliikulite (*ovarian follicle*) areng (Garbiec jt. 2015).

Munasarjafolliikul on iseseisev funktsionaalne üksus, mis koosneb ootsüüdist ning on ümbritsetud follikulaarrakkudega. Liblikatel nimetatakse munasarjafolliikuliks üksust, mis koosneb ootsüüdist, seitsmest abirakust ning seda ümbritseb umbes 5000-st folliikulepiteeli rakust koosnev üksikkiht (Papantonis jt. 2014).

### 2.2.1 Munasarja tüübid

Putukate klassis on kaks peamist munasarjade ovarioolide tüüpi: panoistiline (*panoistic*) ja meroistiline (*meroistic*) (Belles & Piulachs 2015). Panoistilises (eriliste toiterakkudeta) munasarjades arenevad idurakud funktsionaalseteks, viljastamisvõimelisteks ootsüütideks ja iga munasarjafolliikul sisaldab ootsüüti, mis on ümbritsetud ühekihiliselt follikulaarrakkudega. Ootsüüdi tuum (*germinal vesicle*) on transkriptsiooniliselt aktiivne sünteesides vajalikku RNA-d (Tworzydło jt. 2010). Panoistilised munasarjad on iseloomulikud putukate basaalsematele rühmadele, nagu näiteks kivikhüpikulistele (*Archaeognatha*), harjashännalistele (*Zygentoma*), ühepäevikulistele (*Ephemeroptera*), kiilide (*Odonata*), kevikuliste (*Plecoptera*), kojuseliste (*Phasmida*), sihktiivaliste (*Orthoptera*) ja prussakaliste (*Blattodea*) ja röövritsikaliste (*Mantodea*) seltsides (Belles & Piulachs 2015).

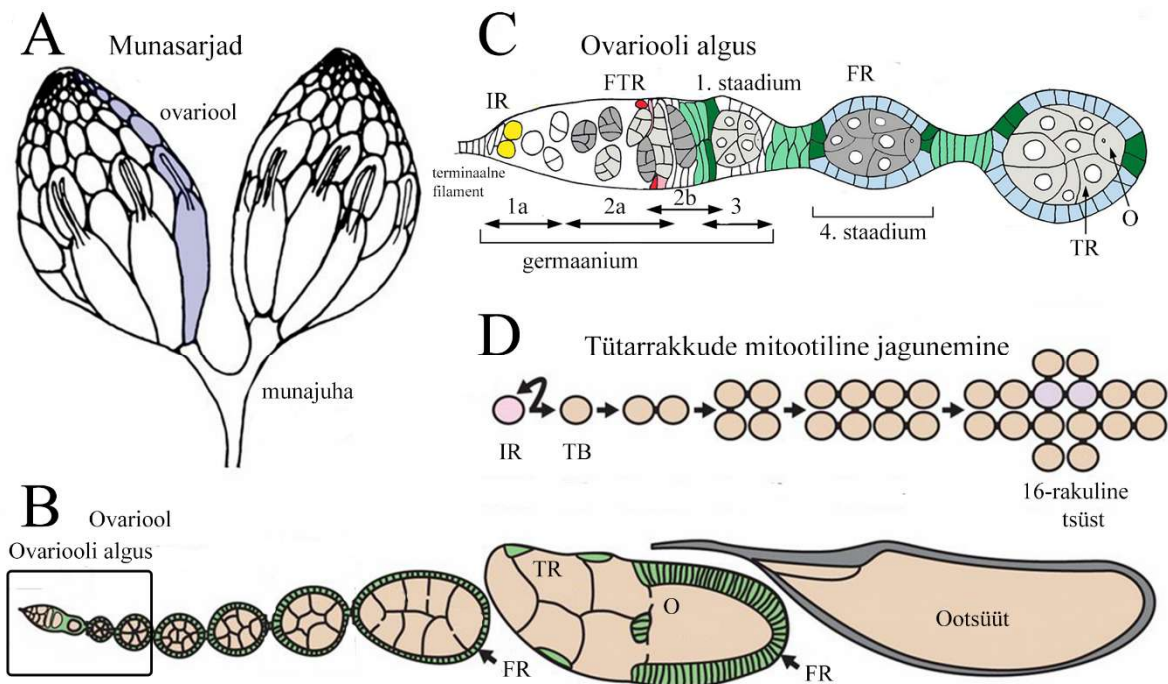
Meroistilistes (toiterakkuderikastes) ovarioolides varustavad ootsüüti mRNA, valkude ja muu rakulise materjaliga spetsiaalsed abirakud. Nimelt osa idurakkudest diferentseeruvad arengu käigus ootsüütideks ja teised abirakkudeks (Tworzydło jt. 2010). Meroistilisel tüübil saab omakorda eristada kahte kategooriat sõltuvalt ootsüüdi ja abirakkude ruumilisest vahekorrast: telotroofset (*telotrophic*) ja polütroofset (*polytrophic*) (Tworzydło jt. 2010).

Telotroofsete meroistiliste munasarjade puhul ei saada abirakud ootsüüte nende teel läbi vitellaariumi, selle asemel abirakud jäävad ovariooli anterioorsesse osasse, mida kutsutakse trofaariumiks (Trauner & Büning 2007). Meroistilised-telotroofsed munasarjad on nokaliste seltsil (*Hemiptera*) ning samuti basaalsemates täismoondega putukate seltsides nagu mardikalised (*Coleoptera*), kaamelkaelalised (*Raphidioptera*) ja suurtiivalised (*Megaloptera*) (Belles & Piulachs 2015).

Meroistilistel-polütroofsetel munasarjadel on üsna suur germaarium ja see sisaldab idutee tütarrakkude (tsüstotsüüdid ing. k. *cystocytes*) tsüste (Tworzydło jt. 2010). Ühest tütarrakust moodustub ootsüüt ja teised moodustavad abirakud (Trauner & Büning 2007).

Polütroofsed meroistilised munasarjad on kõdutäiliste (*Psocoptera*), täiliste (*Phthiraptera*) seltsis ja täismoondega putukatest kiletiivaliste (*Hymenoptera*), ehmeistiivaliste (*Trichoptera*), liblikaliste (*Lepidoptera*) ja kahetiivaliste (*Diptera*) seltsides (Belles & Piulachs 2015).

Putukate bioloogiliste protsesside uurimise üheks peamiseks mudelorganismiks on äädikakärbes. Tema munasarjad on samuti meroistilis-polütroofset tüüpi ning koosnevad 16-20 ovarioolist (Joonis 2. A) (Belles & Piulachs 2015).



**Joonis 2. Äädikakärbe munasarjad ja ovarioolid.** A. Äädikakärbsel on paariline munasari, mis koosneb 16-20 ovarioolist. B., C. Äädikakärbe oogenees on jaotatud 14-sse staadiumisse. Ovariooli apikaalses osas paikneb pärast terminaalset filamenti germaarium, mille 1. regioonis on mitootiliselt jagunenud tsütoblastid 2. regioonis follikulaarrakud ümbritsevad tsüsti 3. ootsüüt liigub posterioorsesse poolusesse, kuhu ta jääb ka ülejäänud oogeneesi ajaks. Selle regiooni rakke nimetatakse 1. staadiumi rakkudeks. 2. staadiumist rakud lahkuvad germaariumist vitellaariumisse. 8.-10. staadiumis toimub kiire ootsüütide kasv ja rebuvalkude omastamine. 10.-12. staadium tsütoplasma kantakse läbi ringkanalite abirakkudelt ootsüüti. 13-14 järele jäänud abirakud ja folliikulepiteelrakud lähevad apoptoosi ja alles jääb koorioniga küps muna. D. 16-rakulise tsüsti moodustumine, rakud on omavahel ringkanalitega ühendatud. Samuti on näha nelja ringkanaliga pro-ootsüüte. FR - follikulaarrakk, IR - idurakk, FTR - follikulaarraku tüvirakk, TR – toiterakk, O - ootsüüt, TB – tsütoblast (modifitseeritud Berns jt. 2014; Ables 2015 järgi).

Liblikate meroistilis-polütroofset tüüpi munasari koosneb neljast ovarioolist, seega on liblikatel kokku 8 ovariooli (Papantonis jt. 2014). Erandiks võib pidada Kobayashi (1994) uuritud liblikaliste kõige primitiivsema alamseltsi *Zeugloptera* esindajat *Neomicropteryx nipponensis*, kellel on mõlemas munasarjas 5 ovariooli.

Uued folliikulid moodustuvad liblikatel perioodiliselt iga ovariooli tipu lähedalt ja küpsed munad vabastatakse munajuhasse selle lõpus (Telfer 2009). Seega koosneb iga ovariool mitmest regioonist: germaariumist (tüviraku regioon), vitellogeneesile eelnevatest (*previtellogenic*) primaarsetest ootsüütidest, vitellogeenestest munadest ja küpsetest koorioniga munadest (Joonis 2. B) (Carter jt. 2013).

## 2.3 Okteti moodustamine

Pärast liblikarööviku kestumist kolmandasse vastsejärku (*instar*), hakkavad toimuma idurakkude jagunemised, mille käigus tekivad 8-rakulised primordiaalseid idurakkude kobarad ovariooli apikaalses osas (Swevers jt. 2005). Idurakkude jagunemine tsüstotsüütide oktetit moodustamiseks algab neljandas vastsejärgus siidiliblikal ning paabusilmastel *Phylosamia cynthia* ja *Hyalophora cecropia* (Telfer 2009).

Idurakkude tüvirakud jagunevad asümmeetriliselt ja tütarakk, mis on lähemal terminaalsele filamendile püsib edasi tüvirakuna ning teine diferentseerub tsütoblastiks (idurakk) (Belles & Piulachs 2015). Idurakk omakorda teeb läbi kolm mitootilist rakujagunemist, mille käigus tekivad tütararakud, mida nimetatakse tsüstotsüütideks. Peale iduraku viimast mitootilist jagunemist on liblikatel lõpptulemuseks tsüstotsüütide oktet, millesse kuuluvad rakud on omavahel ühenduses seitsme ringkanaliga (Telfer 2009). Ühest neist moodustub ootsüüt, ja teised 7 jäävad abi- ehk toiterakkudeks (Telfer 2009). Abirakud on polüploidised rakud mis sünteesivad RNA, valke ja organelle ootsüüdi jaoks (McCall 2004).

Abirakkude arv varieerub liigiti, näiteks äädikakärbsel moodustub 16-rakuline tsüst, seega tal on 15 abirakku ühe ootsüüdi kohta (Belles & Piulachs 2015). Ootsüüdi spetsifikatsiooni üheks mehhanismiks äädikakärbsel on peetud fusoomi. Fusoom on tsütoplasma struktuur, mis seob mitootilise tütaraku iga käävi ühte poolust. Kõik tütararakud on fusoomiga ühenduses ja seeläbi rakud jagunevad ettemääratult. Seeläbi moodustatakse kindla kujuga tsüst, kus kahel rakul on 4 ringkanali ühendust, nendest saavad pro-ootsüüdid. (Joonis 2. D) Järgnev diferentseerumine toimub valkude BicD, Orb, Btz ja Cup ning mRNA nagu *osk*, *BicD* ja *orb* vahendusel. Algselt leidub neid mõlemas pro-ootsüüdis võrdselt kuid lõpuks nende hulk suureneb spetsiifiliselt vaid ühes- ootsüüdis. Seejärel paigutatakse ootsüüt folliikulis posterioorsesse ossa (Huynh & St Johnston 2004). Äädikakärbsel osaleb ootsüüdi posterioorsel paigutusel geen nimega *E-Cadherin*. Liblikatel on oogeneesis osalevaid geene uuritud täpsemalt orasheinasilmikul (*Pararge*

*aegeria*). Selgus, et ka orasheinasilmikul ekspresseeritakse *E-Cadherin*'i, mis osaleb munaraku tsüsti posterioorsesse ossa viimisel ja seega esmasel anterio-posterioorse telje paikapanemisel. Ka fusoomi moodustamiseks transkribeeritakse äädikakärbsel ja orasheinasilmikul sarnaseid geene (näiteks *alpha Spectrin* ja *beta Spectrin*). Samuti on orasheinasilmikul olemas BicD valku kodeerivad geenid (Carter jt. 2013).

## 2.4 Vitellogeneesile eelnev periood (*previtellogenic period*)

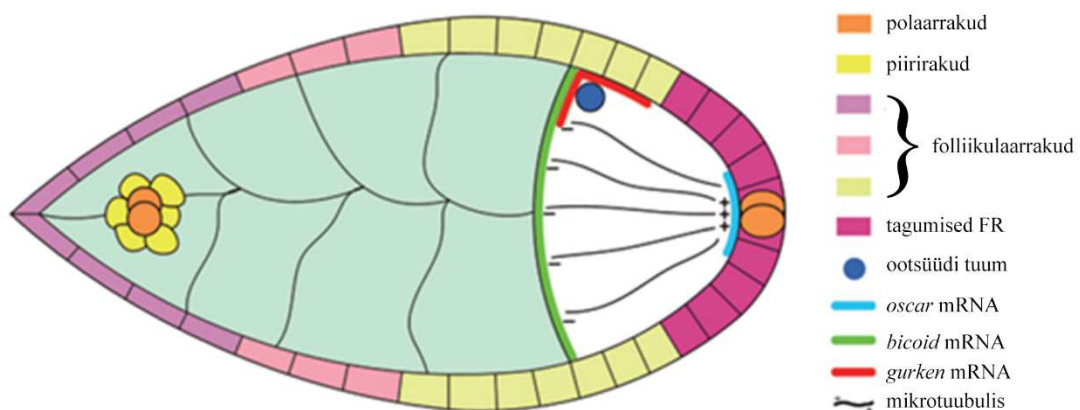
Kõik folliikulid erinevad oma naabrist umbes 2-2,5 h arenguaja poolest, seega kahte sama arengustaadiumiga folliikulit pole (Papantonis jt. 2014). Arenevad folliikulid putukatel võib jagada vastavalt anterio-posterioorsele suunale kolme arenguperioodi: vitellogeneesile eelnev periood (*previtellogenic period*), vitellogenees (*vitellogenesis*) ja koorioni moodustamine (*choriogenesis*) (Swevers & Iatrou 2003).

Vitellogeneesile eelneval perioodil ümbritsevad lõuna-aidaleedikul (*Plodia interpunctella*) follikulaarrakud ootsüüdi-abirakkude kompleksi vastusena hormooni ekdüsteroidi taseme tõusule, mis juhtub 28-36 h pärast nukkumist. Moodustunud folliikulid jäävad vitellogeneesieelsesse etappi kuni 92 h peale nukkumist (Swevers jt. 2005). Ootsüüdi abirakkude kompleks kaetakse follikulaarrakkude kihiga germaariumis, peale mida folliikul läheb edasi vitellaariumi (McCall 2004). Äädikakärbsel eristatakse oogeneesis 14 staadiumit. Vitellogeneesile eelnevaks perioodiks peetakse staadiumeid 2-8 (Hudson & Cooley 2014).

Toiterakkude ülesandeks on tsütoplasma tootmine. Tsütoplasma ringkanalite vahendusel viiakse ootsüüti RNA-d (Telfer 2009). Toiterakkude kromosoomid läbivad endopolüploidse replikatsiooni (kordistab kromosoomide arvu), mis genereerib DNAle kuni 65000 suuruse koopiaarvu tuuma kohta. Polüploidisust uurinud Cardoen jt. (1990) leidsid, et kõige tavalisem koopiaarv tuuma kohta suurtel folliikulite (folliikulid oli jaotatud erisuurusteks toiterakkude ja ootsüüdi ruumala suhtega) toiterakkudel on 32000C. C-väärtus (koopiaarv tuuma kohta) näitab DNA koguhulka organismi kromosoomikomplekti kohta. Seejuures on mõnel tuumal väärtus 65000C ja on leitud ka nii ekstreemne näide nagu 131000C tuuma kohta. Võrdluseks võib tuua, et kahetiivalistel on seni leitud maksimaalne koopiaarv 2048C tuuma kohta. Toiterakud moodustavad ka tsütoplasmat arenevale munale (Telfer 2009). DNA replikatsioon toimub kuni keskmise vitellogeneesini, kui toiterakud ja ringkanalid lagunevad (*disintegrate*) (Telfer 2009).

## 2.5 Vitellogenees

Kuna ovipaarsetel (munejad) loomadel embrüonaalne areng toimib emasorganismist isoleeritult, peab muna seetõttu sisaldama vajalikke varuaineid embrüo arenemiseks. Vitellogeneesi ehk rebumoodustamise ajal viiakse ootsüüti ka morfogeenid, mis osalevad primaarsete kehatelgede määramisel. Näiteks äädikakärbsel on üheks morfogeeniks *gurken* mRNA, mis asub ootsüüdi tuuma lähedal ning osaleb dorso-ventraalse kui antero-posterioorse telje spetsifikatsioonis (Hudson & Cooley 2014). Posterioorses ootsüüdi osas aktiveerib *gurken* posterioorsete (tagumiste) follikulaarrakkude kasvufaktoreid (EGF e. *epidermal growth factor*) (2-6 staadium), mis omakorda korraldavad ümber mikrotuubulite paigutuse (7-10 staadium), mille tulemusena paigutatakse posterioorsesse otsa *bicoid* mRNA ja anterioorsesse otsa *oskar* mRNA. (Joonis 3.) Sellega määratakse nii ootsüüdi kui tulevase embrüo antero-posterioorne polaarsus. Mikrotuubulite ümber polariseerimise käigus ootsüüdi tuum liigub posterioorsest anterioorsesse ossa. Tuum jääb korteksi anterioorsesse ossa, ning sellega paneb paika dorsaalse-anterioorse nurga (Li jt. 2008).



**Joonis 3. Äädikakärbsse ootsüüdi teljed.** Joonisel on kujutatud äädikakärbsse 9. staadiumi ootsüüti, mil on ootsüüt polariseeritud ning ootsüüdi tuum on liikunud anterioorsesse osasse. Pildil on kujutatud posterioorset otsa paremal ning anterioorset vasakul pool. Joonisel on erinevad follikulaarrakud. Telgede moodustamiseks *gurken* mRNA aktiveerib tagumistes follikulaarrakkudes kasvufaktorid, mille järel paigutatakse anterioorsesse ossa *bicoid* mRNA, posterioorsesse ossa *oskar* mRNA. Seejärel nii *gurken* mRNA kui ootsüüdi tuum paigutatakse anterioorsesse ossa. FR - follikulaarrakud (modifitseeritud Li jt. 2008 järgi).

Munasse varutud varuaineid kutsutakse rebuks (Valle 1993). Liblikaliste rebu sisaldab valguga täidetud vesiikuleid, väiksemaid lipiiditilku ja glükogeeni partikleid

(Telfer 2009). Vitellogeneesi ajal ootsüüt kasvab kiiremini võrreldes abirakkudega. Ootsüüdi kasv saavutatakse rebuvalkude endotsütoosiga (Swevers jt. 2005). Rebu moodustumisega ootsüüdi ruumala kasvab sajakordselt. See protsess kasutab valke, lipiide ja süsivesikuid, mis on varutud vastseas. Enamikel liblikatel toimub vitellogenees nukueas, mil liblikas ei toitunud. Seega kasutada olevate varuainete hulk järjest väheneb, mille tulemusena on esimesed munad *Hyalophora* ovarioolides suuremad kui hiljem munetud. Suured, vastseas hästi toitunud isendid munevad valmikuna mitmeid sadu mune rohkem kui need, kes on nukkunud väiksemana (Telfer 2009). Sõltuvalt toidukvaliteedist võib igas ovarioolis olla kuni 75-80 muna (siidiliblika näitel) (Papantonis jt. 2014).

Rebu produktid transporditakse ootsüüti hemolümfish ja follikulaarrakkudest (Telfer 2009). Lipiidivarud on putuka munades nii rebuvalgu kehas (*protein yolk body*) kui ka triatsüülgütserooli tilgakestes (Telfer 2009). Putukate munadesse varutav glükogeen sünteesitakse glükoosist, kui trehhaloos hüdrolyüsitakse hemolümfish (Telfer 2009). Liblikad varustavad oma mune ka ekdüsteroididega (Telfer 2009).

Muna arengusse kaasatavad valgud võivad olla pärit kahest kohast: rasvkehas ja folliikulepiteelist (Swevers jt. 2005). Liblikaliste puhul on peamiseks sünteesitavaks valguks vitellogeniin (Vg). (Telfer 2009). Vitellogeniinid on fosfolipoglükoproteiinid, mille ehitus erineb putukarühmade vahel (Valle 1993). Vitellogeniini rühma valke sünteesitakse ovarioolist väljaspool ning neist saab muna peamine rebuvalk vitelliin. *Hyalophora cecropia*'l ja tubakasurul (*Manduca sexta*) on leitud ootsüüdist ka teine valk, mida sünteesitakse rasvkehas, selleks on mikrovitellogeniin (Valle 1993). Rasvkeha sünteesib ka lipoporiini, mis on hemolümfi koostisosa, ja osaleb lipiidide transpordis (Telfer 2009). Siidiliblikal on ootsüüdis ka hemolümfish pärit valgud, mida kutsutakse „30 Kd valgud“. Lisaks, follikulaarrakkude poolt sünteesitav paravitellogeniin on leitud *H. cecropia*'l ning üks munaspetsiifiline valk (ing. k *egg-specific protein* e. ESP) siidiliblikal (Valle 1993).

Enamikus selgrootute munade massist moodustab vitelliin 70-90%, üheks erandiks on siidiliblikas, kus ta moodustab vaid 30%, sest selles liigil on eelmainitud munaspetsiifilise valgu ja 30 Kd valgu osakaal suur (Valle 1993). Vitellogeniini süntees toimub lühikese perioodi jooksul ja paljudel juhtudel vajab lisaks tsütoloogilisi ümberkorraldusi neis organites, mis on vajalikud selle sünteesiks (rasvkeha) ja omastamiseks (munasari) (Valle 1993). Liblikatel on teada, et vitellogeniini süntees toimub vaid rasvkehas, seevastu kärbestel ja mardikalistel (*Coleoptera*) toimub vitellogeniini süntees ka munasarjas (Valle 1993).

Siidiliblikal moodustab munaspetsiifiline valk 1/3 rebu valgust ootsüüdis (Swevers & Iatrou 2003). Munaspetsiifilise valgu ekspressioon algab umbes 2 päeva pärast nukkumist, kui ekdüsteroidi tase hemolümfis tõuseb haripunkti. ESP ekspressiooni algust saab vaadata kui vitellogeneesi algust siidiliblikal (Swevers jt. 2005).

Follikulaarrakkude funktsiooniks lisaks eelnevalt mainitud valkude sünteesile on ka „kanali moodustamine“, et saaks transportida valke hemolümfist ootsüüti. Vitellogeneesi lõpuks peetakse staadiumit, kus folliikul suureneb peamiselt vee omastamisega ning see avaldab mõju folliikuli kujule ja värvile, seda nimetatakse 0 staadiumiks (Papantonis jt. 2014). Seejärel kanalid kollabeeruvad (*collapse*) (Telfer 2009). Ootsüüdi kasvu viimaseks perioodiks äädikakärbsel peetakse seda kui 11. staadiumis abirakud kontraheeruvad ja nende järele jäänud tsütoplasma viiakse üle ootsüüti (Hudson & Cooley 2014).

## 2.6 Vitellogeneesi järgne periood

Liblikate munakest on kolmekihiline struktuur, mis koosneb sisemisest vitelliinmembraanist e. rebukestast, koorionist ja väga õhukesest välimisest kihist (*sieve layer*) (Swevers jt. 2005).

Vitellogeneesi ajal granuloosse välimusega rebukest eraldab liblikate ootsüüte nende epiteelist. Rebukest kasvab kiiresti vitellogeneesi vältel võimaks katta ootsüüdi laienevat pinda. Rebukesta materjali varutakse jätkuvalt ka siis, kui ootsüüdi kasv lõppeb, ning kuna ootsüüdi pindala jääb samaks, siis selle paksus suureneb mitmeid kordi. Ootsüüt ja follikulaarrakud arenevad nüüd üksteisest sõltumatult (Telfer 2009).

### 2.6.1 Koorioni moodustamine

Follikulaarrakud sünteesivad ja sekreteerivad pärast rebukesta teket valke (moodustavad nt. *Hyalophora* kuivmassist ligi 50%), mis moodustavad sekundaarse munakesta koorioni. Erinevalt putuka kutiikulast, puudub koorionis kitiin ja tema kõvadus tuleneb disulfiidsildadest (Telfer 2009).

Koorioni moodustamise perioodil on folliikulitel kõige suurem metaboolne aktiivsus, nad sünteesivad valke, mis jäävad rebukesta ja folliikulepiteeli üksikkihi vahele. Selle protsessi tulemuseks on koorion, mis annab arenevale ootsüüdile mehhaanilise kaitse. Kui küps ootsüüt liigub munajuhasse, lähevad epiteelrakud lähevad rakusurma (apoptoosi) (Papantonis jt. 2014).



Infraseltsis *Heteroneura*, kuhu kuulub enamik liblikaid, on munadel unikaalsed helikoidsed lammellaarsed koorionid (*unique helicoidal lamellar chorions*), mis võivad anda lisatugevust. Selline on koorioni struktuur ainult liblikate rühmas *Ditrysia*, ning puudub teistes putukaseltsides ja isegi liblikaliste sõsarseltsis ehmeistiivalistel (*Trichoptera*) (Swevers jt. 2005).

Siidiliblika koorion koosneb üle 100 erineva polüpeptiidist, mida sekreteeritakse follikulaarrakkude poolt terminaaalses diferentseerumises. Koorioni moodustamise saab jagada kolme perioodi: 1) varajane koorioni moodustamine, mida iseloomustab C valgu ja mõningal määral A ja B valgu moodustamine 2) keskmine koriogenees (*middle choriogenesis*), kus sünteesitakse enamik A ja B valke 3) hiline koorioni moodustamise etapp (*late choriogenesis*), mis on keskendunud tsüsteiini (*high-cysteine* e. Hc) valkude HcA ja HcB tootmisele (Swevers & Iatrou 2003). Kui koorioni moodustamine on lõppenud, siis folliikulepiteel eraldatakse folliikulist (ovulatsioon) ja küps muna siseneb munajuhasse (Swevers & Iatrou 2003).

## 2.7 Hormonaalne kontroll

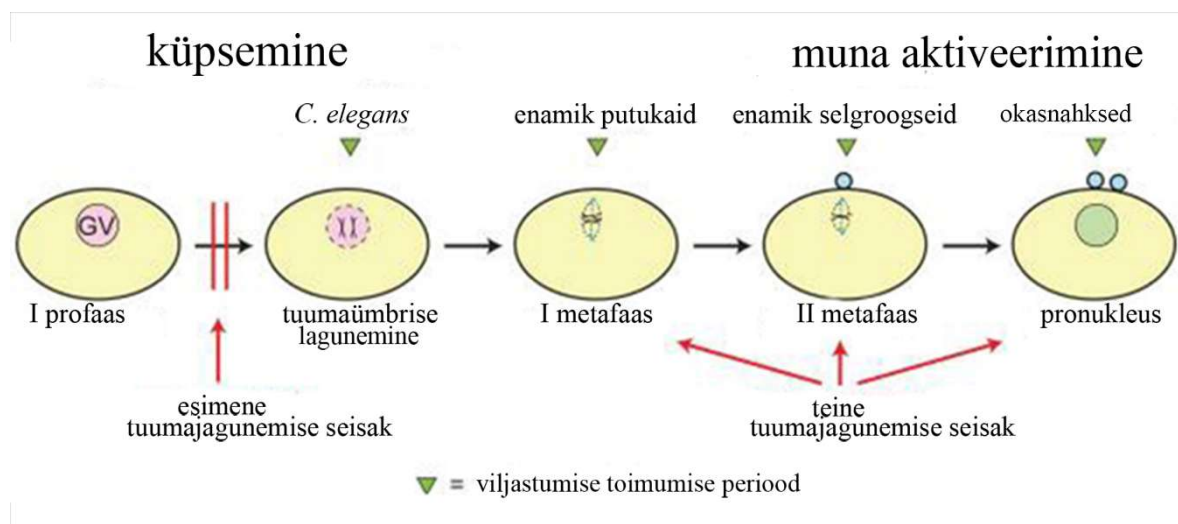
Vitellogeneesi hormonaalne reguleerimine putukatel toimub peamiselt kahe hormooni abil, milleks on ekdüsooni aktiivne vorm on 20-hüdroksüekdüsoon (20E) ja juveniilhormoon (JH) (Valle 1993). Liblikalistel, kellel vitellogenees algab alles valmikueas, sõltub vitellogenees JH-st. Need liigid, kellel vitellogenees on jagatud nuku- ja valmikustaadiumi vahel, sõltuvad JH-st osaliselt ja need liigid, kellel vitellogenees toimub juba enne nukustaadiumi, arenevad JH-st sõltumatult (Raikhel jt. 2005). Näiteks *Hyalophora*'l, kellel on juba nuku staadiumisse kestudes munajuhas ovuleerunud munad, toimub vitellogeniini süntees ka saaterakkude ja JH puudumisel (Telfer 2009). Seevastu perekonnas *Manduca* algab vitellogenees 3-4 päeva enne valmiku koorumist, mistõttu toimub vitellogenees ka saaterakkude puudumisel, kuid ootsüüdi kasvu lõpetamiseks ja koorioni moodustamiseks on vajalik JH olemasolu. Liblikatel, kellel vitellogenees algab pärast valmikuks saamist (näiteks ratsulibliklased ja paljud öölased), stimuleerib JH vitellogeneesi (Raikhel jt. 2005).

20-hüdroksüekdüsoon mõjutab nii otseselt kui kaudselt paljusid protsesse, näiteks okteti diferentseerumist ootsüüdiks ja abirakkudeks ning vitellogeniini sünteesi (Telfer 2009). Ekdüsoon on ekdüsteroid, mis reguleerib kestumisprotsesse vastse arengujärgus. Seda sünteesitakse protorakaalnäärmetes, mida stimuleerib protorakotroopne hormoon

(PTTH). Rasvkehas muudetakse ekdüsoon tema aktiivsesse vormi, milleks on 20-hüdroksüekdüsoon. Valmikeas protorakaalnäärmed kaovad ja ekdüsooni sünteesi võtavad üle kas munasarja rakud nagu metsasääsel *A. aegypti*’l või spetsiifilised tagakeha rakud nagu äädikakärbsel (Valle 1993).

## 2.8 Meioos ja viljastumine

Liblika vastse viimase arengujärgu lõpus on tekkinud tsüstotsüütide oktetid (Swevers jt. 2005). Lisaks on iga oktetit raku tuumades detekteeritavad sünaptoneemilised kompleksid, mis viitab sellele, et viimases vastsejärgus läbivad kõik 8 rakku meioosi I profaasi. Seoses metamorfoosi algusega alustavad abirakud endomitootilist kromosoomi replikatsiooni, mille käigus tõuseb märkimisväärselt DNA sisaldus. Ootsüüt seevastu läbib meioosi hiljem, ehkki kasvamisajaks jääb ootsüüt I profaasi (primaarne arest) (Joonis 4.) (Telfer 2009).



**Joonis 4. Meioosi arestid oogeneesis ja viljastumise hetk erinevatel loomarühmadel.** Enamikul liikidel, sealhulgas putukatel toimub primaarne meioosi arest ootsüüdi kasvufaasis I profaasis. Hormonaalse vastusena taasaktiveeritakse meioos, mis peatub uuesti I metafaasis (sekundaarne meioosi arest). Sellel perioodil toimub ka putukatel viljastumine. *C. elegans*’il on sekundaarne arest I profaasi tuuma lagunemise ajal (ing. k *germinal vesicle breakdown* e. *GVBD*). Selgroogsetel on sekundaarne arest II metafaasis ning okasnahksed viiakse meioos lõppstaadiumini. Meiootiline areng jätkub pärast viljastamist kõikidel gruppidel (v.a okasnahksed, kellel viljastamine kutsub esile mitootilise jagunemise) (modifitseeritud Kim jt. 2013 järgi).

Varajases profaasis on tavaline liblikatel meioosi rada järgmine: leptopteen, sügoteen, kuid ilma kiasmideta pahhüteeni staadium (Traut jt. 2007). Liblika meioosile oogeneesis on seega iseloomulik ristsiirde (*crossing over*) puudumine (Carter jt. 2013). Diploteeni ja diakineesi staadiumite asemel jätkub „muudetud pahhüteen“ („*modified*

*pachytene*“) ning homoloogid paarduvad ja bivalendid lühenevad ning muutuvad tihedamaks kuni metafaas I-ni (Traut jt. 2007).

Äädikakärbse puhul on teada, et pro-ootsüüdid, kellel on 4 ringkanalit moodustavad sünaptoemilise kompleksi enne kui ülejäänud abirakud. Edasiselt kõik rakud, peale ootsüüdi väljuvad meioosist, ja sünaptoemiline kompleks säilib vaid ootsüüdis (Orr-Weaver 1995). Lisaks on teada, et sünaptoemiline kompleks laguneb vitellaariumis 6 staadiumis (Orr-Weaver 1995)

Küpsemisperioodiks peetakse arenguetappi, mil hormoonide mõjul jätkatakse tuumajagunemist (Orr-Weaver 1995). Pärast vitellogeneesi, enne viljastumist nii äädikakärbse kui liblika ootsüüt on sekundaarses meiootilises arestis I metafaasis (Joonis 4.) (Swevers jt. 2005). Metafaasi käävi moodustumine toimub äädikakärbse 14 staadiumis (Orr-Weaver 1995). Käävi poolustel pole tsentrioole ega valke, mis oleks tsentrosoomide koostises. (Megraw & Kaufman 2000). Emasorganismi munasarjades on siis seega ootsüüdid arestitud meioosi I metafaasis ning ootsüüdi ümbrised (rebukest ja koorion) on palju läbilaskvamad kui viljastatud munal (Bloch Qazi jt. 2003).

Mõnedel putukatel algab ovulatsioon algab alles peale paaritumist, äädikakärbsel toimub ovulatsioon ka vähesel määral ilma paaritumiseta. Paaritumata emastel kulgeb ovulatsioon väga aeglaselt (umbes 1 muna päevas) ja paaritumine tõstab oluliselt ovulatsiooni kiirust, mis on nähtav 1.5 h pärast paaritumist (Bloch Qazi jt. 2003).

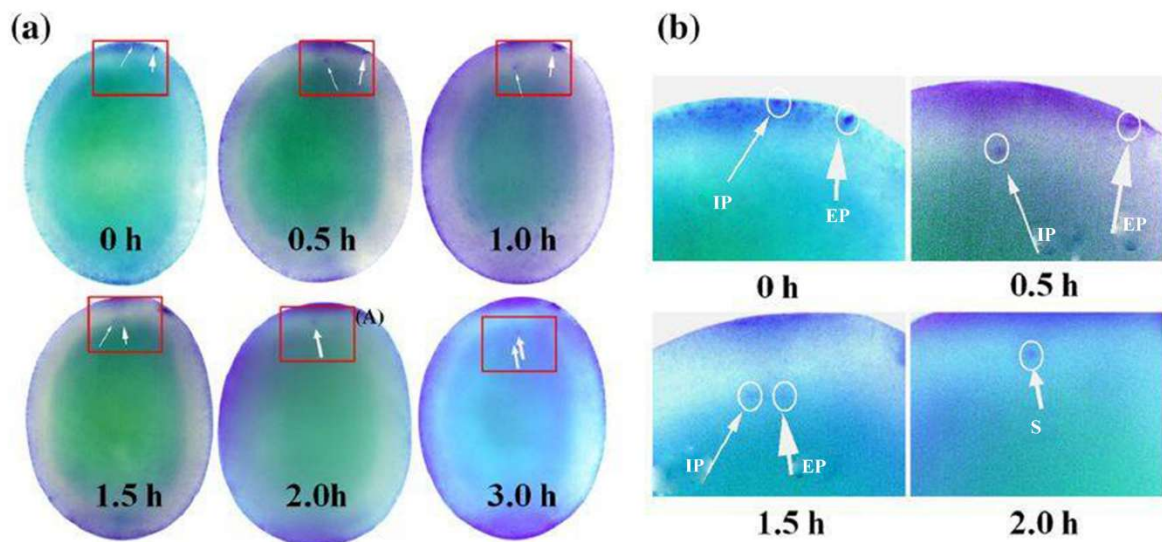
Ovulatsioon toimub, kui ootsüüt vabastatakse munasarjast ja toimub üleminek ootsüüdist munaks (*ovum*). Ovulatsiooni käigus reguleeritakse ootsüüdi vabastamist. Muuhulgas toimuvad ootsüüdis muudatused muna ümbristes ja erinevate valkude translatsioonid ning ootsüüt saab valmis viljastumiseks. Seda protsessi nimetatakse muna aktiveerimiseks (Bloch Qazi jt. 2003). Vähe on teada, mis juhtub folliikulepiteeliga pärast valminud muna aktiveerimist munajuhas. Kõige tõenäolisemalt on tulemuseks folliikulepiteeli rakkude surm läbi apoptoosi. (Swevers jt. 2005).

Siidiliblikal väljub muna metafaasi I arestist siis, kui spermarakk siseneb munasse (Kawamura 2001). Siidiliblika munad viljastatakse, kui nad jõuavad seemne-vesiikulisse, kuhu seemnevedelik on varem paaritumise ajal kogutud (Tao jt. 2015).

Meioosi käigus tekib neli haploidset tuuma. Sellest tuumast, mis on kõige kaugemal (*distal*) muna koorest (*cortex*), areneb välja ootsüüdi pronukleus. Teistes haploidsetes tuumades kromatiin kondenseeritakse ja nad muutuvad polaarkehadeks (Megraw & Kaufman 2000).

Kohe peale munemist vabaneb ootsüüt metafaas I arestist, ning on sel ajal veel kas metafaasis või juba anafaasis, kus toimub esimene küpsusjagunemine (Tanaka 1985). I meioosi jagunemise käävid on atsentriloosed (Megraw & Kaufman 2000). Käävi asend on perpendikulaarne või paralleelne muna pinnaga (karuslase *Amata fortunei* näitel). Esimene küpsusjagunemine toimub 40 minuti jooksul munemisest (*A. fortunei* näitel) (Tanaka 1985).

Meioosi II jagunemise käävid pannakse kokku I meioosi anafaasis. II meioosi käävid oma telgedega on seotud muna poolustega (*pole-to-pole*) ning asuvad muna pinna suhtes perpendikulaarselt (risti), kuid *A. fortunei* näitel võib mõni kord ka kääv olla paralleelselt (Megraw & Kaufman 2000). Küpsusjagunemistega on 1,5 h jooksul pärast munemist *A. fortunei*'l moodustunud kolm sama suurusega polaarkeha ja emaspronukleus (Tanaka 1985). Isaspronukleus peab liikuma läbi paksu rebu emaspronukleuse poole. See liikumine võtab siidiliblikal aega samuti umbes 2 h ja *A. fortunei*'l aega 2,5 h (Tao jt. 2015; Tanaka 1985). Emaspronukleus liigub samuti ootsüüdi keskele, kus ta liitub isaspronukleusega (Joonis 5.). Polaarkehad jäävad muna korteksisse ning emas ja isas pronukleuste ühinevad rebus, mis on umbes 1/5 kaugusel anterioorsest poolustest (Tanaka 1985; Megraw & Kaufman 2000).



**Joonis 5. Emas ja isaspronukleuste ühinemine.** Pildil on ajaskaala siidiliblika munemisest. IP - isaspronukleus, EP - emaspronukleus, S - süntaarion (modifitseeritud Tao jt. 2015 järgi).

### 3. Soo määramise mehhanismid

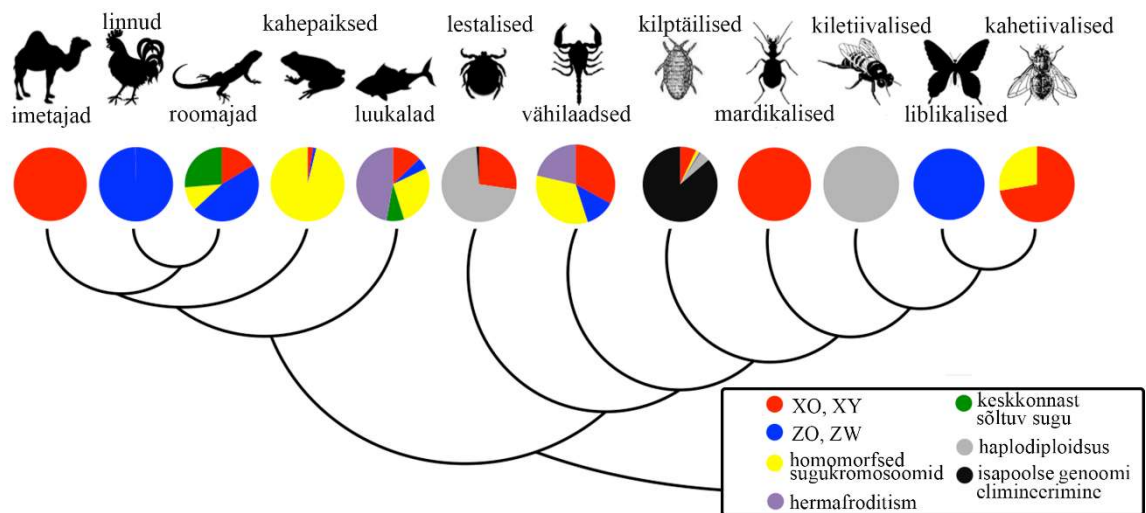
#### 3.1 Ülevaade soo determinatsioonist loomadel

Loomadel on soo määramise mehhanismid varieeruvad. Selgroogsetel määratakse sugu enamasti kromosomaalselt (nimetatakse genotüübiliseks soo determinatsiooniks, *genotypic sex determination*, GSD) või mõnel juhul ka keskkonnast sõltuvalt (*enviromental sex determination*, ESD) (Joonis 6.) (Bull 1983; Quinn jt. 2011).

Keskkonnast sõltuv soo määramine tähendab seda, et sugu on määratud väliste tingimuste poolt. Roomajatel võib sugu olla määratud näiteks temperatuuriga (Guler jt. 2012; Bachtrog jt. 2014). On teisigi võimalusi, näiteks kirpvähiliste sugu määratakse valgusperioodi pikkusega (Guler jt. 2012; Bachtrog jt. 2014) ja osal korallrahu kaladest on sugu määratud sotsiaalsete teguritega (Kobayashi jt. 2013; Bachtrog jt. 2014).

GSD, kus sugu määratakse üheselt isendi genotüübi poolt on iseloomulik näiteks imetajatele. Imetajatel on isased heterogameetsed (XX emased, XY isased) ning sugu määratakse ära Y-kromosoomis asuva *SRY* geeniga (Smith jt. 2009; Koopman jt. 1991; Quinn jt. 2011). Lindudel on emased heterogameetsed (ZZ isased, ZW emased) ning isane sugu on määratud kahekordse Z-kromosoomi *DMRT1* geenidoosiga. Nii areneb kahte ZZ sugukromosoomi omav embrüo isaseks ja WZ emaseks. (Smith jt. 2009; Quinn jt. 2011). Kaladel, kahepaiksetel ja roomajatel on samuti geneetiline soo määramine, olenevalt liigist on heterogameetne emane või isane (Bull 1983; Quinn jt. 2011).

Soo määramise mehhanisme on teisigi, näiteks on võimalik see määrata ka kogu genoomiga. Haplodiploidsetel organismidel (sipelgad, herilased, mesilased) on isased arenevad viljastamata haploidsetest munadest ning emased viljastatud diploidsetest munadest. Kilptäide isastel aga elimineeritakse või inaktiveeritakse isapoolsed kromosoomid (Bull 1983; Bachtrog jt. 2014). Lisaks kõik sugukromosoomid ei ole diferentseerunud, näiteks püütonitel on sugukromosoomid morfoloogiliselt sarnased ehk homomorfed (Vicoso jt. 2013; Bachtrog jt. 2014). Umbes 5% loomaliikidest on hermafrodiitsed ehk mõlemasoolised organismid. Hermafrodiidid on näiteks mõned kalad ja paljud selgrootud nagu teod, korallid, imiussid ja vääneljalgsed (Jarne & Auld 2006; Bachtrog jt. 2014).



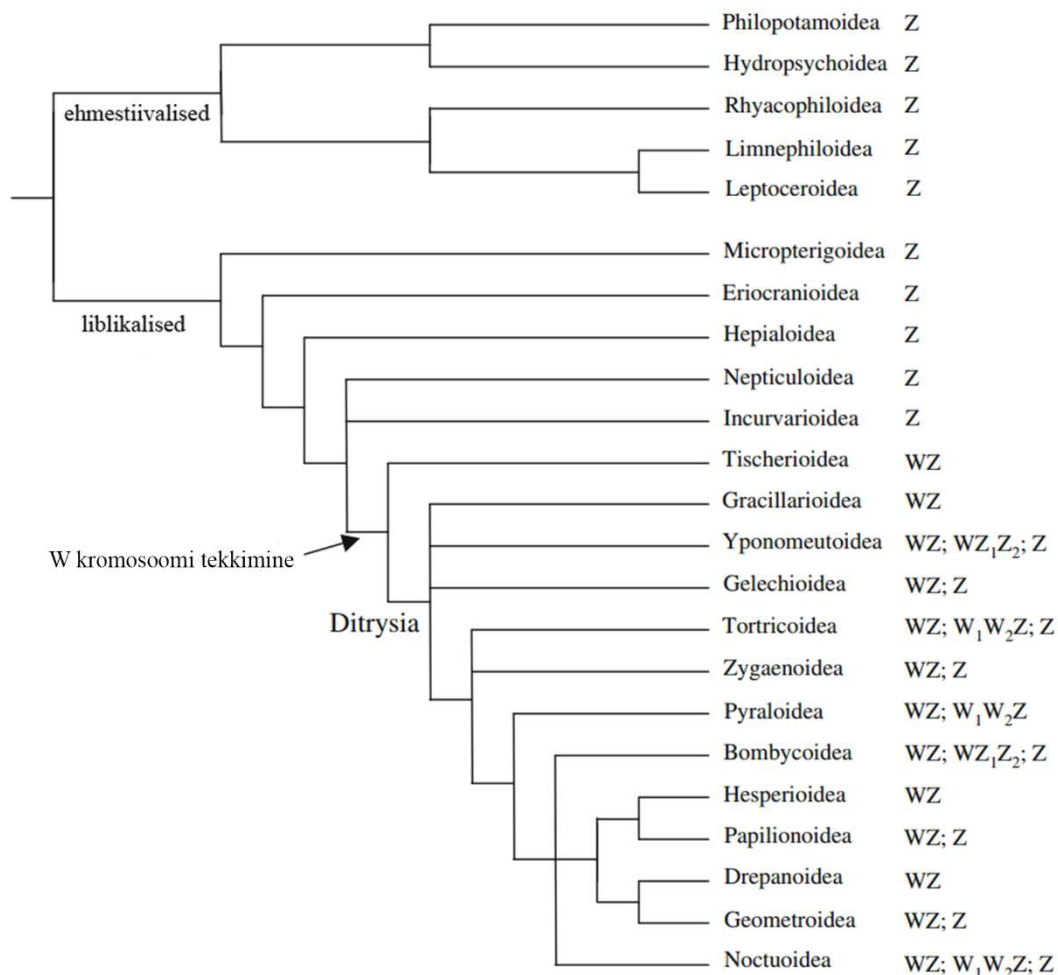
**Joonis 6. Soo determinatsiooni võimalused.** Soo määramise mehhanismid erinevatel loomadel: imetajatel (pärisimetajad, kukkurloomad ja ainupilulised), lindudel, roomajatel (sisalikud, maod, krokodillid, kilpkonnad), kahepaiksetel (konnad, kärnkonnad, salamandrid), luukaladel, lestalistel (lestad, puugid), vähilaadsetel (vääneljalalised, krevetid, krabid), kilptäilistel, mardikalistel, kiletiivalistel (mesilased, herilased, sipelgad), liblikalistel ja kahetiivalistel (kärbised). Sektordiagramm esitab ligilähedaselt selliste liikide osakaalu, kel on vastavad soomääramise mehhanismid dokumenteeritud (modifitseeritud Bachtrog jt. 2014 järgi).

### 3.2 Soo määramise mehhanismid putukatel

Putukatel on mitmesuguseid soo määramise mehhanisme, näiteks äädikakärbsel on soofenotüüp määratud X kromosoomide arvuga, kahe X-kromosoomiga isend (XX) on emane ja ühe X-kromosoomiga isend (XY) on isane (Erickson & Quintero 2007; Gempe & Beye 2011). Osal kahetiivalistest, näiteks harilikul toakärbsel (*Musca domestica*), on sugupool määratud Y kromosoomi olemasoluga: emased on XX, isased XY (Dübendorfer jt. 2002; Gempe & Beye 2011). Mõnedel putukatel (nt. *Megaselia scalaris*) ei ole sugukromosoomidel nähtavaid erinevusi, nende kromosoomid on homomorfseid (Traut 1994; Gempe & Beye 2011). Kilptäiliste, karilaste ja kiletiivaliste isased on haploidsed ning emased diploidsed (Bull 1983; Gempe & Beye 2011).

Putukatel on üldjuhul isased heterogameetsed, kuid näiteks ülemseltsis *Amphiesmenoptera* (siia kuuluvad liblikalised ja ehmeistiivalised (*Trichoptera*)) on emane heterogameetne (Traut jt. 2007). Selline emaste heterogameetsus on tekkinud nende ühisel eellasel rohkem kui 180 miljonit aastat tagasi (vanimad fossiilid leitud 180-190 MAT) (Sahara jt. 2012). Kõikidel siiani uuritud ehmeistiivalistel on Z/ZZ sugukromosoomi süsteem (Marec & Novák 1998). Liblikalistele on kõige iseloomulikum sugukromosoomisüsteem WZ/ZZ, kuid esineb ka Z0/ZZ, W<sub>1</sub>W<sub>2</sub>Z/ZZ ja WZ<sub>1</sub>Z<sub>2</sub>/Z<sub>1</sub>Z<sub>1</sub>Z<sub>2</sub>Z<sub>2</sub>

süsteeme (Joonis 7.) (Nagaraju jt. 2014). Z0/ZZ süsteem on liblikate basaalsemates gruppides, kuna W kromosoom ilmus 97 miljonit aastat tagasi *Ditrysia* ja *Tischerioidea* ühisel eellasel (Joonis 7.) (Sahara jt. 2012). ZW/ZZ süsteemiga liblikatel on sugu määratud W kromosoomi olemasoluga (Sahara jt. 2012).



**Joonis 7. Sugukromosoomide süsteem liblikalistel ja ehmestiivalistel.** Fülogeneesipuul on näidatud millal tekkis W kromosoom *Ditrysia* liblikate ja *Tischerioidea* ülemsugukonna ühisel eellasel. (Modifitseeritud Sahara jt. 2012 järgi.)

### 3.2.1 Primaarne ja sekundaarne soo määramine liblikatel

Sugukromosoomide jaotus muna ja polaarkeha vahel otsustab tulevase sügooti sugukromosoomide koosseisu ja järgnevalt soo kujunemise embrüos. ZZ embrüod arenevad isasteks, WZ emasteks (Z0 emasteks, ZZ isasteks). Kuna meioosi jagunemiste käigus areneb ainult üks neljast tuumast pronukleuseks ja teistest saavad polaarkehad, siis WZ bivalendi orientatsioon või Z univalendi asend metafaas I käävis määrab muna sugukromosoomid (Traut jt. 2007).

Hall-koimärslasel (*Taleporia tubulosa*) on Z/ZZ süsteemiga soo määramine. Meioosi käigus paardumata Z kromosoom on positsioneeritud tänu meioosikäävile kas ootsüüdi või polaarkeha poole ning käävi orientatsiooni aitab reguleerida välistemperatuur. Nimelt kui temperatuur on kõrgem (30-37°C), siis Z kromosoom on nihutatud sisemise käävipooluse poole ja seeläbi on järglaste seas rohkem ZZ isaseid. Kui ümbritsev temperatuur on külmem (3-8.5°C), siis Z kromosoom liigub välimise pooluse poole (polaarkeha poole), mistõttu on rohkem Z0 emaseid (Seiler 1920; Traut jt. 2007).

Niisiis liblikate primaarne signaal soo määramise rajal on kas W kromosoomiga seotud emassugu määrav signaal või kogusest sõltuv isassugu määrav signaal Z kromosoomides (Sahara jt. 2012). Soo määramise mehhanisme on palju uuritud siidiliblikal, kelle W kromosoomilt ekspresseeritakse tugevat emassugu määravat signaali, mis on seotud *Fem* piRNA-ga (*female-enriched PIWI-interacting RNAs*) (Kiuchi jt. 2014). *Fem* piRNA aitab ka alla reguleerida maskuliniseerimise eest vastutava geeni *Masculinizer* (*Masc*) ekspressiooni (Kiuchi jt. 2014). Kui embrüos on W kromosoom, siis temast saab emane, vaatamata sellele palju on Z kromosoome ning kui W puudub, saab temast isane (Sahara jt. 2012). Z/ZZ süsteemiga liikidel oleneb sugu Z kromosoomi arvust, kui on üks siis areneb emane, kuid ZZ areneb isaseks. Pole leitud geene, mille doosist sugu sõltuks (Sahara jt. 2012). Samuti pole teada, kas teistel liikidel peale siidiliblika, kel on WZ/ZZ süsteem, on sugu määratud W kromosoomil paikneva emast määrava faktoriga või Z kromosoomi hulgaga (Sahara jt. 2012).



## 4. Referatiivne ülevaade muna suuruse sugulisest dimorfismist

### 4.1 Muna suuruse suguline erinevus on leitud

Budriene jt. (2013) uurisid enda katsetes üksielavat herilast *Symmorphus allobrogus*, kelle emased on isastest suuremad. *S. allobrogus* 'e isase/emase kehakaalu suhe on 0,62. Töö eesmärgiks oli uurida sugulise dimorfismi kujunemise kolme viisi olulisust ontogeneesis. Muna ruumala hindamiseks mõõdeti nii selle pikkus kui ka laius ning võeti arvesse ka muna kuju (silinder poolkerakujuliste otstega).

Uurimistöös leiti märkimisväärne soo-spetsiifiline erinevus muna suuruses. Nimelt olid emasteks arenevad munad keskmiselt pikemad ( $2,25 \pm 0,03$  mm) ja laiemad ( $0,73 \pm 0,01$  mm,  $n=28$ ), kui munad, kellest arenesid isased (pikkus  $2,15 \pm 0,03$  mm ja laius  $0,69 \pm 0,01$ ,  $n=34$ ). Emasteks ja isasteks arenevate munade maksimaalne suurus oli peaaegu võrdne, kuid isasteks arenevate munade minimaalne suurus oli märkimisväärselt väiksem. Seega jätab *S. allobrogus* väiksemad munad viljastamata. Emase muna keskmine ruumala oli 16,3% suurem kui isasel. Samuti olid emased isasest suuremad ka äsja koorunud vastsete hulgas ning suuruste erinevuse kasv jätkus pärast koorumist.

Jayasingh (1980) uuris oma töös herilase *Pachodynerus nasidens* kärjekannude varustamist õietolmuga. See liik muneb munad kärjekannudesse enne seda, kui sinna toitaineid kogub. Vaadeldi, kuidas erinevad sooti kärjekannude suurus ja varuainete hulk. Katsete käigus selgus, et ajaintervallid kahe munemise vahel on pikemad enne emaseks kui enne isaseks areneva muna munemist (keskmine aeg  $27,78 \pm 5,01$  h vs  $17,76 \pm 3,5$  h). Samuti leiti, et emased munad on pikemad (keskmine pikkus  $2,97 \pm 0,13$  mm) kui isased munad ( $2,4 \pm 0,28$  mm). Tehti järeldus, et emaste munade munemine võib võtta rohkem aega seetõttu, et neid saaks viljastada ja rebu juurde lisada; lisaks arvati, et viljastamata, isaseks arenevad munad saavad küpsemaks kiiremini. Uurimistöö käigus leiti ka seos munade munemise vahelise aja ja kärjekannude varuaine hulga vahel. Nimelt emaherilane panustab kärjekannu rohkem varuaineid kui samaaegselt valmistub emaseks arenevat muna munemiseks (võtab kauem aega). See tähendab, et kärjekannus arenev isend saab vastsena vähem toitaineid kui järgmine munetav muna on isaseks arenev muna ja rohkem toitaineid, kui järgmine munetav muna on emaseks arenev muna. Tavaliselt munetakse emaseks arenevad munad enne kui isaseks arenevad munad.

Walzer ja Schausberger (2015) uurisid oma töös toidustressi mõju röövlestadele *Neoseiulus californicus*, *Phytoseiulus persimilis* ja *Amblyseius andersoni*. Nendele liikidele on omane pseudo-arhenotookia ehk isapoolse genoomi elimineerimine. Nii isaseks kui emaseks arenevad munad viljastatakse ja on alguses diploidsed. Isasteks arenevate munade arengu käigus isapoolne genoom kaob ja seejärel on need munad haploidsed. Kõikide liikide muna suurused ei olnud seotud emase keha suurusega, vaid sõltusid saagi arvukusest. Samuti sõltus järglaste sugu muna suurustest *P. persimilis*'el ja *N. californicus*'el. Kõikide liikide emased munesid väiksemal saagitihtedusel võrdselt mõlemat sugu munasid, kuid tingimuste paranedes emaste munade osakaal kasvas.

Leiti, et *P. persimilis*'e isaseks arenevad munad on kõikidel toitumistingimustel väiksemad kui emaseks arenevad munad. Samas sõltub muna suurus saagi arvukusest. Kehvades toitumistingimustes olid mõlemat sugu munad väiksemad kui kõrgematel saagitihtedustel. Mõõdukate toitumistingimuste korral suurendas *P. persimilis* munade arvu ning emase ja isase muna suurused vastavalt tõusid. Kui saaki oli arvukalt, siis isaste munade suurus ei muutunud, kuid emaste munade suurus vähenes, seejuures munade arv suurenes. Seega oli tegemist soospetsiifilise lõivsuhtega munade suuruse ja munade arvu vahel.

*N. californicus*'l on mõlema soo munad sarnase suurusega väikse saagitihteduste korral. Halbades toitumistingimustes on muna suurus mõlemal sool on väiksem kui paremates tingimustes. Kui saagitihtedus suureneb, siis nii isaste kui emaste muna suurus kasvab, kuid emase muna suurus on alati suurem kui isase muna suurus.

*A. andersoni* munad olid kõige väiksemad halbades toitumistingimustes. Paremates tingimustes jäi muna suurus sugude vahel sarnaseks. Üle kõigi saagitihteduste arvutatud keskmistena olid *A. andersoni* isased munad ( $0,020 \pm 0,00012 \mu\text{l}$ ) väga vähe väiksemad kui emase munad ( $0,021 \pm 0,000111 \mu\text{l}$ )

Macke jt. (2011) uurisid oma katsetes soo sõltuvust muna suurusest haplodiploidsel kedriklestal *Tetranychus urticae*. Katsetes võrreldi nii emaste kui isaste munade suurusi nii viljastamata (kes toodavad vaid isaseid mune) kui ka paaritunud emastel. Paaritunud emaste munetud munadest arenesid suguküpse isendini 321: 261 arenesid emasteks, 60 isasteks. Emased olid keskmiselt märkimisväärselt suuremad kui isased juba munastaadiumis. Suuremal munal oli oluliselt suurem tõenäosus areneda emaseks. Kui muna oli suurem kui  $5,04 \times 10^4 \mu\text{m}^2$ , mis oli emaste muna suuruse keskmine, siis 93% tõenäosusega arenes temast emane. Samas kui muna suurus oli väiksem kui isaste muna keskmine suurus  $4,66 \times 10^4 \mu\text{m}^2$ , siis tõenäosus areneda emaseks oli alla 54%.

## 4.2 Muna suuruse sugulist erinevust ei ole leitud

Tammaru jt. (2010) kasutasid oma katsetes kevadpaabusilma (*Saturnia pavonia*). Töö eesmärgiks oli arendada sugulise dimorfismi uuringutes kasvujärgupõhist lähenemist ning uurida, kuidas ja millal dimorfism ontogeneesis kujuneb. Kevadpaabusilma suured mõõtmised andsid võimaluse uurida ka munade ning äsja koorunud vastse suurusi.

Uurimuse tulemused näitasid sugulise dimorfismi kujunemist väga varajases ontogeneesis, nimelt juba teises kasvujärgus olid emased 12% isastest raskemad. Sellegipoolest, kevadpaabusilma munade suuruses ja äsja koorunud vastsete suuruses soospetsiifilisi erinevusi ei leitud. Muna suuruste mõlema soo keskmine oli  $\pm$  SE:  $1,95 \pm 0,02$  mg, ja emaste vastsete kaal oli  $1,30 \pm 0,02$ , isaste kaal  $1,27 \pm 0,01$  mg.

Schenk ja Söndgerath (2005) kasutasid oma töös üheksat vesikiillaste liiki. Katsetes uuriti muna suuruse varieeruvust kahes erinevas kurnatüübis. Samuti uuriti muna suuruse mõju vastse edaspidisele edukusele. Uuriti muna suuruse seost koorumisajaga, järglaste sooga ning suurusega. Väike-rabakiil (*Leucorrhinia dubia*) kasvatati viimase vastsejärguni ja ranna-loigukiil (*Sympetrum striolatum*) valmikuni ning neil liikidel ei leitud muna suuruse seotust järglaste sooga.

Ernsting ja Isaaks (2002) uurisid oma töös hooghännalist *Orchesella cincta*. Vaadeldi sugulise dimorfismi kujunemist ning uuriti, kas see on kooskõlas soospetsiifiliste sigimisrollide poolt tekitatud loodusliku valiku survetega. Uurimuse kõrvaltulemused näitasid, et tulevaste emaste ja isaste vahel polnud erinevusi muna mõõtmistes, arengukestuses ning samuti ka äsja koorunud vastsete kaalus. Erinevused kujunesid välja pärast koorumist, nimelt arenesid isased lühemat aega ja madalamal kasvukiirusel ning isased olid seetõttu valmikuna emastest väiksemad.

Yasuda ja Dixon (2002) kasutasid oma katsetes kakstäpp-lepatriinut (*Adalia bipunctata*), kelle emased on isastest suuremad vaatamata sellele, et arengukestus sooti ei erine. Uurimuse eesmärgiks oli selgitada välja sugulise dimorfismi kujunemise mehhanismid ning kontrollida väidet arengukestuse võrdsusest sugude vahel. Uurimistöö käigus kaaluti ka mune (12h jooksul peale munemist). Töö tulemusena selgus, et emaseks ja isasteks arenenud munade kaaludes ei olnud erinevust. Seega muna suurus ei põhjustanud kaks-täpp lepatriinul sugulist dimorfismi. Dimorfism kujunes seetõttu, et emased vastsed tarbisid rohkem toitu ning nende kasvukiirus oli suurem.

Kim (1999) uuris emase lehemesilase *Megachile apicalis* kärjekannude varustamist. Samas uurimistöös on ta välja toonud, et muna suurus sooti sellel liigil ei varieeru. Lehemesilase muna suurust ennast on uuritud tema 1996 töös.

## Arutelu

Käesoleva bakalaureusetöö eesmärk oli uurida muna suuruse soolist erinevust kui üht võimalust soolise dimorfismi kujunemiseks ontogeneesis putukatel.

Liblikatel on alimentaarne oogenees ning munasarjad on meroistilis-polütroofset tüüpi. Liblika ootsüüt ei ole oogeneesi vältel transkriptsiooniliselt aktiivne. Selle asemel varustavad kasvavat ootsüüti mRNA, valkude ja muu rakulise materjaliga spetsiaalsed toiterakud. Vitellogeneesi lõpus abirakud kontraheeruvad, toiterakkude tsütoplasma viiakse ootsüüti ning kasvufaas lõpeb. Seejärel moodustatakse follikulaarrakkude abil sekundaarne munakest koorion. See kõik tähendab, et muna suurus on määratud emase liblika poolt juba enne koorioni moodustumist ja sellele järgnevat viljastumist.

Koorioniga ümbritsetud rakk on meioosi sekundaarses arestis I metafaasis. I metafaasis on kromosoomid kogunenud käävide abil (mikrotuubulitest koosnev süsteem) ekvatoriaaltasandile (metafaasiplaat). Liblika sugukromosoomide (WZ bivalent või Z univalent) orientatsioon määrab ära tulevase muna sugukromosoomid (teistest moodustub polaarkeha). Sperma sisenemine munarakku taaskäivitab meioosi ning I anafaasis lahknevad poolustele kromosoomid sõltuvalt käävi asendist. Seega tulevase liblika sugu võib sõltuda käävi orientatsioonist ja polarisatsioonist. Kasvava ootsüüdi tsütoplasma pole homoloogne mass, vaid on väga determineeritud. Vitellogeneesi vältel viiakse ootsüüti ema (toiterakkude) poolt mitmesuguseid morfogeene, mis tagavad ootsüüdi kindla polariseeritusse. Äädikakärbsel näiteks *gurken* mRNA mõjutab nii anterio-posterioorset kui dorso-ventraalset telge, samuti viiakse tema toimel ootsüüdi tuum anterioorsesse ossa. Kas ja kuidas sellised maternaalsed komponendid liblikate oogeneesis meioosikäävi orientatsiooni ja paiknemist mõjutavad, ei ole teada.

On võimalik, et teatud tingimustel on kasulikum toota ühte sugupoolt ning vastavaid signaale saab liblikas ümbritsevast keskkonnast, mis suunavad emaliblika toiterakke panustama munaraku arengusse molekulaarseid determinante, mis aitavad metafaasi arestis olevatel ootsüütidel meioosikäävi ja sellega seonduvaid kromosoome orienteerida vastavalt polarisatsiooni signaalidele. Lisaks võib hüpoteetiliselt sõltuvalt keskkonna tingimustest varieeruda rebuvalkude ja morfogeenide hulk. Üheks näiteks, mil keskkonnast tulenevad signaalid mõjutavad meioosikäävi asendit on ka töös käsitletud hall-koimärslane, kellel on näidatud, et välistemperatuur on oluline faktor käävi orientatsiooni kujunemisel ning sellega seoses ka sugukromosoomi paiknemisel, mis omakorda mõjutab sugu. Ehkki küsimus sellest, kas emaliblikas suudab meioosikäävi

orientatsiooni mõjutada vastavalt muna suurusele jääb lahtiseks, ei leitud käesolevas bakalaureusetöös käsitletud kirjanduse põhjal ühtegi asjaolu, mis viitaks sellele, et selline mehhanism poleks võimalik.

Siiski ei leidnud ma püstitatud hüpoteesi „muna suurus on üks soolise dimorfismi kujunemise viisiks ontogeneesis“ tõenduseks kirjandusest näited liblikate kohta. Siin on oluline ka asjaolu, et vastavaid uurimusi on vähe. Siiani on soolise dimorfismi kujunemise uurimuste keskmes olnud kasvuperiood ja kasvukiirus. Samas leidub uurimusi, kus suguline dimorfism kujuneb välja väga varakult. Näiteks tubakasurul kujunes sooline dimorfism välja juba siis, kui vastseperioodist oli läbitud 25% (Stillwell jt. 2014).

Rohkem on teada haplodiploidsete putukate (nt. kiletiivalistel *Symmorphus allobrogus* ja *Pachodynerus nasidens*) kohta, kellel on leitud sooti erinev munasuurus (Jayasingh 1980). Lüljalgsete seas on muna suuruse dimorfismi leitud ka haplodiploidisel kedriklestal *T. urticae* ning pseudo-arhenotooksetel röövlestadel *P. persimilis* ja *N. californicus*. Siin tuleb aga silmas pidada, et sugu määratakse neil organismidel teistmoodi kui liblikatel. Nimelt pseudo-arhetookia on nähtus, mil viljastatud diploidsest munast isapoolne genoom elimineeritakse ning haplodiploidsetes organismides arenevad viljastamata munad isasteks. Seeläbi oleks kiletiivalisel justkui lihtsam muna suuruse järgi otsustades jätta osa neist viljastamata. Lisaks erinevale munasuurusele, on täheldatud, et lehemesilane *Megachile rotundita* panustab neisse kärjekannudesse, kuhu muneb munad, millest arenevad emased, rohkem varuaineid. See asjaolu küll munasuurust ei mõjuta, kuid näitab, et emane mesilane aitab soolisel dimorfismil varakult välja kujuneda (Klostermeyer jt. 1973).

Liblikatega sarnaselt on ka lindudel ZW/ZZ sugukromosoomi süsteem, samuti on ka neil emane heterogameetne. Lindudel on näidatud sugulist dimorfismi muna suuruses. Näiteks valgekiird-sidrikul (*Zonotrichia leucophrys*), koduvarblase (*Passer domesticus*) ja muusträsta (*Turdus merula*) suurem sugupool ehk isased kooruvad suurematest munadest. Samas on ka hoopiski vastupidiseid näiteid nagu ibeeria kuldnokk (*Sturnus unicolor*) ja värvuline *Cinclorhampus cruralis*, kelle isased on täiskasvanuna suuremad, kuid kooruvad väiksematest munadest. Suguline dimorfism on ka näiteks Ameerika tuuletallajal (*Falco sparverius*), kelle emased on täiskasvanuna suuremad, kuid kooruvad väiksematest munadest (Rutkowska jt. 2014).

Lõpetuseks järeldan, et sooti erinev muna suurus võib olla üks soolise dimorfismi põhjustajatest ning seda on liiga vähe uuritud. Vähest uuritust näitab asjaolu, et ainuke artikkel, mis käsitles liblikate soo determinatsiooni signaale meioosi I metafaasis pärineb

aastast 1920. Samuti on muna suuruse uurimist pidurdanud asjaolu, et soolise dimorfismi ontogeneetiliste uuringute keskmes on siiani olnud arengukestus ja kasvukiirus. Siiski tuleb silmas pidada, et tegemist on oletustega ning hüpoteesi ei ole otseselt kinnitatud ega ümber lükatud, katseline töö hüpoteesi testimiseks on seega igati tervitatav.

## Kokkuvõte

Putukatel, sealhulgas liblikatel, on emased enamasti suuremad kui isased. Uurimused soolise dimorfismi kujunemisest ontogeneesis on siiani keskendunud arengukestusele ja kasvukiirusele. Käesolev töö uurib liblikate muna suurust kui soolise dimorfismi ühte kujunemisviisi ontogeneesis. Töös on käsitletud munaraku arengu ja soo determinatsiooni mehhanisme keskendudes liblikatele.

Liblikatel toimub ootsüüdi kasv spetsiaalsete toiterakkude abil ja see peatub enne viljastumist. Seega muna suurus on määratud emaliblika poolt. Tihtipeale on esimesena munetud munad suuremad kui järgmised. Selline suuruse erinevus on seotud emaliblika vastseas kogutud varuainete hulga järkjärgulise vähenemisega.

Liblikatel on genotüübiline soo determinatsioon. Liblikatel on kõige levinum ZW/ZZ sugukromosoomisüsteem, kuid on ka ZO/ZZ süsteemi. Munarakk on viljastamise hetkel I metafaasi arestis, see tähendab, et kromosoomid on ekvatoriaaltasandil ühendatud meiosisikäävidega. Liblikate sugukromosoomide orientatsioon sel hetkel määrab ära tulevase liblika soo. Oogeneesi vältel viiakse arenevasse ootsüüti erinevad morfogeenid, mis tagavad ootsüüdi polariseeritusse ja võivad seeläbi mõjutada seda, millised kromosoomid satuvad meioosil munarakku ja millised polaarkehadesse.

Muna sooti erinevat suurust putukatel kirjanduse ülevaates on dokumenteeritud vaid kiletiivalistel. Liblikate kohta on vaid üks asjakohane uurimus, selles ei leitud soolisi erinevusi muna suuruses. Käsitletud kirjandusest ei ilmnenu siiski ühtegi asjaolu, miks muna suurus ei võiks mõjutada järglase sugu ka genotüübilise soo determinatsiooniga putukatel.



## Summary

In insects, including Lepidoptera, females are usually larger than males. So far, studies on the ontogeny of sexual size dimorphism (SSD) have been focusing on development time and growth rate. The present study evaluates the possibility that also sex-specific differences in egg size can contribute to the ontogenetic development of SSD. To provide the necessary background, the present study gives an overview of oocyte development and sex determination mechanisms focusing on Lepidoptera.

In Lepidoptera, oocyte growth is facilitated via nurse cells and it stops before fertilization. Thus, egg size is determined maternally. Frequently, however, eggs that are laid first are larger than the following ones. The reason for this pattern is in the gradual decrease in the amount of nutrients accumulated during the larval period.

In Lepidoptera sex is determined by sex chromosomes (genotypic sex determination). Most common sex chromosome system is WZ/ZZ, but also ZO/ZZ is presented. Oocyte is in metaphase I during the fertilization. This means that the chromosomes are arranged on the metaphase plate and connected with meiotic spindles. Sex chromosome orientation, in that moment, determines the sex of the insect. During the oogenesis, nurse cells contribute cytoplasm and different morphogens to the developing oocyte. These morphogens determine oocyte polarity and thus, can possibly affect which chromosomes will be in the egg and which in the polar body.

Case studies on egg size dimorphism have only documented SSD in egg size in Hymenoptera. In Lepidoptera, there was only one relevant study, and in this study no differences in egg size were found. However, in the literature reviewed, no reasons could be found that would exclude the possibility of SSD being present already in egg sizes, also among insects with genotypic sex determination.

## **Tänuavaldused**

Täna südamest oma juhendajaid Toomas Tammarut, Tambet Tõnissood ja Riho Meierit lõputöö juhendamise, suunamise ja kõiksugu abi eest.

## Kasutatud kirjanduse loetelu:

- Ables, E.T., 2015. Drosophila oocytes as a model for understanding meiosis: an educational primer to accompany “corolla is a novel protein that contributes to the architecture of the synaptonemal complex of Drosophila”. *Genetics*, 199(1): 17–23.
- Bachtrog, D. jt., 2014. Sex determination: why so many ways of doing it? *PLoS Biology*, 12(7), e1001899.
- Badyaev, A.V., 2002. Growing apart: an ontogenetic perspective on the evolution of sexual size dimorphism. *Trends in Ecology & Evolution*, 17(8): 369–378.
- Belles, X. & Piulachs, M.D., 2015. Ecdysone signalling and ovarian development in insects: From stem cells to ovarian follicle formation. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1849(2): 181–186.
- Berns, N. jt., 2014. A genome-scale in vivo RNAi analysis of epithelial development in Drosophila identifies new proliferation domains outside of the stem cell niche. *Journal of Cell Science*, 127(12): 2736–2748.
- Blanckenhorn, W.U. jt., 2007. Proximate causes of Rensch’s rule: does sexual size dimorphism in arthropods result from sex differences in development time? *The American Naturalist*, 169(2): 245–257.
- Bloch Qazi, M.C., Heifetz, Y. & Wolfner, M.F., 2003. The developments between gametogenesis and fertilization: ovulation and female sperm storage in Drosophila melanogaster. *Developmental Biology*, 256(2): 195–211.
- Bonduriansky, R. & Rowe, L., 2005. Intralocus sexual conflict and the genetic architecture of sexually dimorphic traits in *Prochyliza xanthostoma* (Diptera: Piophilidae). *Evolution*; 59(9): 1965–1975.
- Budriene, A., Budrys, E. & Nevronyte, Ž., 2013. Sexual size dimorphism in the ontogeny of the solitary predatory wasp *Symmorphus allobrogus* (Hymenoptera: Vespidae). *Comptes Rendus - Biologies*, 336(2): 57–64.
- Bull, J., 1983. *Evolution of Sex Determining Mechanisms.*, Menlo Park, CA.: Benjamin/Cummings, 316 lk
- Buntin, G.D. & Pedigo, L.P., 1983. Morphology of the Male and Female Reproductive Systems of *Plathypena scabra* (F.) *Journal of Kansas Entomological Society*, 56(3): 377–386.
- Cardoen, J. jt., 1990. Polyploidy in the Nuclei of Ovarian Nurse and Follicle Cells of the Silk Moth, *Hyalophora-Cecropia*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 15(2): 93–100.
- Carter, J.-M. jt., 2013. Unscrambling butterfly oogenesis. *BMC genomics*, 14: 283.
- Cordero, P.J. jt., 2001. Seasonal variation in sex ratio and sexual egg dimorphism favouring daughters in first clutches of the spotless starling. *Journal of Evolutionary Biology*, 14(5): 829–834.
- Dübendorfer, A. jt., 2002. *Musca domestica*, a window on the evolution of sex-determining mechanisms in insects. *International Journal of Developmental Biology*,

46(1): 75–79.

- Erickson, J.W. & Quintero, J.J., 2007. Indirect effects of ploidy suggest X chromosome dose, not the X:A ratio, signals sex in *Drosophila*. *PLoS biology*, 5(12): 332.
- Ernsting, G. & Isaaks, J.A., 2002. Gamete production and sexual size dimorphism in an insect (*Orchesella cincta*) with indeterminate growth. *Ecological Entomology*, 27(2): 145–151.
- Esperk, T. jt., 2007. Achieving high sexual size dimorphism in insects: females add instars. *Ecological Entomology*, 32(3): 243–256.
- Fairbairn, D.J., 1997. Allometry for Sexual Size Dimorphism: Pattern and Process in the Coevolution of Body Size in Males and Females. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 28(1): 659–687.
- Fairbairn, D.J. & Blanckenhorn, W.U., 2007., Introduction: the enigma of sexual size dimorphism. Teoses: *Sex, Size and Gender Roles: Evolutionary Studies of Sexual Size Dimorphism*. T. Székely, ed., London: Oxford University Press, 287 lk.
- Garbiec, A. jt., 2015. Asymmetry in structure of the eggshell in *Osmylus fulvicephalus* (Neuroptera: Osmylidae): an exceptional case of breaking symmetry during neuropteran oogenesis. *Protoplasma*: 1–10.
- Gempe, T. & Beye, M., 2011. Function and evolution of sex determination mechanisms, genes and pathways in insects. *BioEssays*, 33(1): 52–60.
- Guler, Y. jt., 2012. Integrating field and laboratory evidence for environmental sex determination in the amphipod, *Echinogammarus marinus*. *Marine Biology*, 159(12): 2885–2890.
- Gustafsson, A. & Lindenfors, P., 2004. Human size evolution: no evolutionary allometric relationship between male and female stature. *Journal of Human Evolution*, 47(4): 253–266.
- Holden, C. & Mace, R., 1999. Sexual dimorphism in stature and women's work: a phylogenetic cross-cultural analysis. *American Journal of Physical Anthropology*, 110(1): 27–45.
- Hormiga, G., Scharff, N. & Coddington, J.A., 2000. The phylogenetic basis of sexual size dimorphism in orb-weaving spiders (Araneae, Orbiculariae). *Systematic biology*, 49(3): 435–462.
- Hudson, A.M. & Cooley, L., 2014. Methods for studying oogenesis. *Methods*, 68(1): 207–217.
- Huynh, J.R. & St Johnston, D., 2004. The origin of asymmetry: Early polarisation of the *Drosophila* germline cyst and oocyte. *Current Biology*, 14(11): 438–449.
- Ituarte, C., 2009. Unusual modes of oogenesis and brooding in bivalves: The case of *Gaimardia trapesina* (Mollusca: Gaimardiidae). *Invertebrate Biology*, 128(3): 243–251.
- Jarne, P. & Auld, J.R., 2006. Animals mix it up too: the distribution of self-fertilization among hermaphroditic animals. *Evolution*, 60(9): 1816–1824.
- Jayasingh, D.B., 1980. A new hypothesis on cell provisioning in solitary wasps. *Biological*

- Journal of the Linnean Society*, 13(2): 167–170.
- Kawamura, N., 2001. Fertilization and the first cleavage mitosis in insects. *Development Growth and Differentiation*, 43(4): 343–349.
- Kim, J.Y., 1999. Influence of resource level on maternal investment in a leaf-cutter bee (Hymenoptera: Megachilidae). *Behavioral Ecology*, 10(5): 552–556.
- Kim, J.Y., 1996. Maternal investment and reproductive strategies of an adventive leaf-cutter bee, *Megachile apicalis* (Hymenoptera: Megachilidae), Davis California: Univesity California.
  - Kim, S., Spike, C. & Greenstein, D., 2013. Control of oocyte growth and meiotic maturation in *Caenorhabditis elegans*. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 757: 277–320.
- Kiuchi, T. jt., 2014. A single female-specific piRNA is the primary determiner of sex in the silkworm. *Nature*, 509(7502): 633–636.
- Klostermeyer, E.C., Mech, S.J. & Rasmussen, W.B., 1973. Sex and weight of *Megachile rotundata* (Hymenoptera: Megachilidae) progeny associated with provision weights. *Journal of the Kansas Entomological Society*, 46(4): 536–548.
- Kobayashi, Y., 1994. Ovarian Structure of a Zeuglopteran Moth, *Neomicropteryx nipponensis* (Lepidoptera, Micropterigidae). *Japanese Journal of Entomology*, 62(1): 93–100.
- Kobayashi, Y., Nagahama, Y. & Nakamura, M., 2013. Diversity and plasticity of sex determination and differentiation in fishes. *Sexual development*, 7(1-3): 115–125.
  - Koopman, P. jt., 1991. Male development of chromosomally female mice transgenic for Sry. *Nature*, 351(6322): 117–121.
- Li, Q. jt., 2008. Lethal(2)giant larvae is required in the follicle cells for formation of the initial AP asymmetry and the oocyte polarity during *Drosophila* oogenesis. *Cell Research*, 18(3): 372–384.
- Lindenfors, P., Tullberg, B. & Biuw, M., 2002. Phylogenetic analyses of sexual selection and sexual size dimorphism in pinnipeds. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 52(3): 188–193.
  - Lovich, J.E. & Gibbons, J.W., 1992. A review of techniques for quantifying sexual size dimorphism. *Growth, Development, and Aging*, 56(4): 269–281.
- Macke, E. jt., 2011. Sex allocation in haplodiploids is mediated by egg size: evidence in the spider mite *Tetranychus urticae* Koch. *Proceedings of the Royal Society B: Biological sciences*, 278: 1054–1063.
- Marec, F. & Novák, K., 1998. Absence of sex chromatin corresponds with a sex-chromosome univalent in females of Trichoptera. *European Journal of Entomology*, 95(2): 197–209.
- McCall, K., 2004. Eggs over easy: cell death in the *Drosophila* ovary. *Developmental biology*, 274(1): 3–14.
- Megraw, T.L. & Kaufman, T.C., 2000. The centrosome in *Drosophila* oocyte development. *Current Topics in Developmental Biology*, 49: 385–407.

- Nagaraju, J. jt., 2014. Lepidopteran sex determination: A cascade of surprises. *Sexual Development*, 8(1-3): 104–112.
- Norman, M.D. jt., 2002. First encounter with a live male blanket octopus: The world's most sexually size-dimorphic large animal. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*, 36(4): 733–736.
- Orr-Weaver, T.L., 1995. Meiosis in *Drosophila*: seeing is believing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(23): 10443–10449.
- Papantonis, A., Swevers, L. & Iatrou, K., 2014. Chorion Genes: A Landscape of Their Evolution, Structure, and Regulation. *Annual Review of Entomology*, 60: 177–194.
- Quinn, A.E. jt., 2011. Evolutionary transitions between mechanisms of sex determination in vertebrates. *Biology Letters*, 7(3): 443–448.
- Raikhel, A.S., Brown, M.R. & Belles, X., 2005. Hormonal control of reproductive processes. Teoses: *Comprehensive Molecular Insect Science*. L. I. Gilbert, K. Iatrou, & S. S. Gill, eds., Amsterdam: Elsevier.
- Ralls, K., 1976. Mammals in which females are larger than males. *The Quarterly Review of Biology*, 51(2): 245–276.
- Rutkowska, J., Dubiec, A. & Nakagawa, S., 2014. All eggs are made equal: Meta-analysis of egg sexual size dimorphism in birds. *Journal of Evolutionary Biology*, 27(1): 153–160.
- Sahara, K., Yoshido, A. & Traut, W., 2012. Sex chromosome evolution in moths and butterflies. *Chromosome Research*, 20(1): 83–94.
- Schenk, K. & Söndgerath, D., 2005. Influence of egg size differences within egg clutches on larval parameters in nine libellulid species (Odonata). *Ecological Entomology*, 30(4): 456–463.
- Schutz, D. & Taborsky, M., 2000. Giant males or dwarf females: what determines the extreme sexual size dimorphism in *Lamprologus callipterus*? *Journal of Fish Biology*, 57(5): 1254–1265.
  - Seiler, J., 1920. Geschlechtschromosomenuntersuchungen an Psychiden. I. Experimentelle Beeinflussung der geschlechtsbestimmenden Reifeteilung bei *Talaeporia tubulosa*. *Retz. Arch Zellforsch*, 15: 249–268.
  - Smith, C.A. jt., 2009. The avian Z-linked gene DMRT1 is required for male sex determination in the chicken. *Nature*, 461(7261): 267–271.
  - Smith, R.J. & Leigh, S.R., 1998. Sexual dimorphism in primate neonatal body mass. *Journal of Human Evolution*, 34(2): 173–201.
- Stillwell, R.C., Daws, A. & Davidowitz, G., 2014. The ontogeny of sexual size dimorphism of a moth: when do males and females grow apart? *PloS ONE*, 9(9): e106548.
- Swevers, L. jt., 2005. Maturation of the Insect Ovarian Follicle. Teoses: *Comprehensive Molecular Insect Science*, L. I. Gilbert, K. Iatrou, & S. S. Gill, eds., Amsterdam: Elsevier.
- Swevers, L. & Iatrou, K., 2003. The ecdysone regulatory cascade and ovarian development

- in lepidopteran insects: Insights from the silkworm paradigm. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 33(12): 1285–1297.
- Tammaru, T. jt., 2010. Proximate sources of sexual size dimorphism in insects: Locating constraints on larval growth schedules. *Evolutionary Ecology*, 24(1): 161–175.
- Tanaka, M., 1985. Early embryonic development of *Amata fortunei* (Lepidoptera, Amatidae). *Recent Advances in Insect Embryology in Japan*, 139–155.
- Tao, H. jt., 2015. Parental environmental exposure leads to glycometabolic disturbances that affect fertilization of eggs in the silkworm *Bombyx mori*: the parental transcript legacy. *Journal of Comparative Physiology B*, 185(1): 47–55.
- Teder, T., 2014. Sexual size dimorphism requires a corresponding sex difference in development time: A meta-analysis in insects. *Functional Ecology*, 28(2): 479–486.
- Teder, T. & Tammaru, T., 2005. Sexual size dimorphism within species increases with body size in insects. *Oikos*, 108(2): 321–334.
- Telfer, W.H., 2009. Egg formation in lepidoptera. *Journal of Insect Science*, 9(50): 1–21.
- Trauner, J. & Büning, J., 2007. Germ-cell cluster formation in the telotrophic meroistic ovary of *Tribolium castaneum* (Coleoptera, Polyphaga, Tenebrionidae) and its implication on insect phylogeny. *Development Genes and Evolution*, 217(1): 13–27.
- Traut, W., 1994. Sex determination in the fly *Megaselia scalaris*, a model system for primary steps of sex chromosome evolution. *Genetics*, 136(3): 1097–1104.
- Traut, W., Sahara, K. & Marec, F., 2007. Sex chromosomes and sex determination in Lepidoptera. *Sexual Development*, 1(6): 332–346.
- Tworzydło, W. jt., 2010. Ovaries and germline cysts and their evolution in Dermaptera (Insecta). *Arthropod Structure & Development*, 39(5): 360–368.
- Valle, D., 1993. Vitellogenesis in insects and other groups: a review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 88(1): 1–26.
- Vicoso, B., Kaiser, V.B. & Bachtrog, D., 2013. Sex-biased gene expression at homomorphic sex chromosomes in emus and its implication for sex chromosome evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(16): 6453–6458.
- Vollrath, F., 1998. Dwarf males. *Trends in Ecology & Evolution*, 13(4): 159–163.
- Walzer, a. & Schausberger, P., 2015. Food stress causes sex-specific maternal effects in mites. *Journal of Experimental Biology*, 218(16): 2603–2609.
- Wiklund, C. & Forsberg, J., 1991. Sexual Size Dimorphism in Relation to Female Polygamy and Protandry in Butterflies: A Comparative Study of Swedish Pieridae and Satyridae. *Oikos*, 60(3): 373–381.
- Yasuda, H. & Dixon, A.F.G., 2002. Sexual size dimorphism in the two spot ladybird beetle *Adalia bipunctata*: Developmental mechanism and its consequences for mating. *Ecological Entomology*, 27(4): 493–498.
- tähistatud viidetega pole tutvunud.

**Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks**

Mina, Merili Martverk,

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose, Sooti erinev muna suurus liblikatel, mille juhendajateks on Toomas Tammaru, Tambet Tõnissoo ja Riho Meier.
  - 1.1.reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;
  - 1.2.üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.
2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, **19.05.2016**